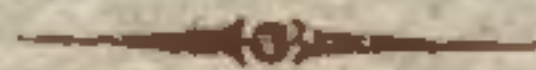


Б.И.ЗБАРСКИЙ, И.Б.ЗБАРСКИЙ,
А.И. СОЛНЦЕВ

ПРАКТИКУМ
ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ
ХИМИИ



МЕДГИЗ - 1954

Б. И.

ПО

ВТ

Б. И. ЗБАРСКИЙ, И. Б. ЗБАРСКИЙ,
А. И. СОЛНЦЕВ

2. Александров

ПРАКТИКУМ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

ВТОРОЕ ИЗДАНИЕ, ИСПРАВЛЕННОЕ
И ДОПОЛНЕННОЕ



ГОСУДАРСТВЕННОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО
МЕДИЦИНСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ
МЕДГИЗ — 1954 — МОСКВА

П
Перво
мин, вы
Автор
отзывов,
издания
вались
дополнен
Насто
мин пол
ченных з
тодики,
занятий
пользова
ческих
Автор
славшим

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие ко второму изданию	Стр. 3
Предисловие к первому изданию	4

Химия белков

Цветные реакции на белки	8
Реакции осаждения белков	19
Диализ белка	29
Определение изоэлектрической точки белка	30
Кислотный гидролиз белков	34
Определение азота аминных групп методом формольного титрования	37

Нуклеопротейды

* Получение дезоксирибонуклеопротейда	44
* Реакция на дезоксирибонуклеиновую кислоту	45
Получение нуклеопротейда из дрожжей	46
Гидролиз нуклеопротейда	47

Ферменты

Гидролиз крахмала	50
Термолабильность ферментов	54
Специфичность ферментов	56
Влияние pH на действие ферментов	58
Качественная реакция на уреазу	61
Качественные реакции на оксидазы	62
Качественные реакции на пероксидазу	65
Качественная реакция на каталазу	67
Качественные реакции на дегидразы	68
Количественное определение дегидраз мышц	70
* Количественное определение протеиназ по способу Метта	72
Определение амилазной активности слюны и мочи	73
* Количественное определение каталазы крови по Баху	76
и Зубковой	79
* Количественное определение липазы	81
* Ферментативный синтез изоамиломасляного эфира	81

Витамины и гормоны

Качественная реакция на витамин А	84
* Количественное определение витамина А	86
* Количественное определение каротина по Рачевскому	90
	345

	Стр.
Разделение каротиноидов методом хроматографической адсорбции по Цвету	93
Реакция на витамин B ₁ (тиамин)	95
Реакция на никотиновую кислоту и ее амид	96
Определение витамина С	98
Реакция на адреналин	103

Липиды и их обмен

Обнаружение жиров	105
Растворение и эмульгирование жиров	107
Переваривание жиров	108
Реакции на ацетоновые тела	111
Реакции на холестерин	114
Обнаружение холестерина в мозгу	117
* Количественное определение холестерина в крови по Энгельгардту и Смирновой	118
Обнаружение лецитина в желтке куриного яйца	123

Углеводы и их обмен

Качественные реакции на углеводы	127
Переваривание крахмала амилазой поджелудочного сока	137
Количественное определение сахара в крови	138
* Количественное определение сахара в крови при сахарной нагрузке	142
Влияние инсулина на количество сахара в крови	144
Влияние адреналина на количество сахара в крови	147
Проба на брожение	148
Использование неорганического фосфата в процессе брожения	151
Гликолиз	153

Обмен белков

Переваривание белка пепсином	159
Переваривание белка трипсином	160
* Действие эрепсина на пептон	163
Освобождение биологических жидкостей от белков	164
Определение общего и остаточного азота в сыворотке крови	165
Определение свободных аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге	177
* Переаминирование аминокислот	181
* Определение аминокислот газометрическим методом по Цуверкалову	184
Качественные реакции на мочевины	191
Количественное определение мочевины в моче по Бородину	195
Количественное определение аммиака в моче	204
Реакции на креатинин	206
Обнаружение креатина в мышечной ткани	208
Обнаружение карнозина в мышечной ткани	209
Количественное определение креатинина и креатина в моче	210
Мочевая кислота	213

Кровь

	Стр.
* Свертывание крови	217
* Определение скорости свертывания крови	220
* Определение протромбина по Боровской и Ровинской	221
* Определение щелочного резерва кровяной плазмы	224
Получение кристаллов гемина	233
Гваяковая проба на кровь	235
Бензидиновая проба на кровь	236
Спектральный анализ пигментов крови	236
Проба на карбоксигемоглобин	239
Исследование кровяных пятен	240
* Определение количества гемоглобина	241
Определение кальция в сыворотке крови	243
Определение хлора в крови	246
* Определение неорганических фосфатов в сыворотке крови	249

Желчь

Реакции на желчные пигменты	251
Реакции на желчные кислоты	254
Обнаружение холестерина в желчных камнях	256

Желудочный сок

Реакции на свободную соляную кислоту	259
Реакция на молочную кислоту	261
Титрование кислот желудочного содержимого	262
Реакция на кровь в желудочном соке	267
Открытие желчи в желудочном соке	268

Моча

Определение удельного веса мочи	270
Исследование цвета мочи	271
Исследование прозрачности мочи	271
Исследование запаха мочи	272
Определение реакции мочи	272
Колориметрическое определение рН мочи	273
Реакция на хлориды	274
Количественное определение хлоридов в моче	274
Реакция на сульфаты	278
Реакция на фосфаты	279
Качественные реакции на белок в моче	280
Количественное определение белка	282
Качественные реакции на сахар в моче	283
Количественное определение сахара в моче	286
Реакции на ацетоновые тела в моче	291
Качественные реакции на кровяные пигменты в моче	293
Реакции на желчные пигменты в моче	295
Реакция на желчные кислоты в моче	296
Реакции на уробилин и уробилиноген	296

Реакции на индикан	Стр. 299
Микроскопическое исследование мочи	300
* Анализ мочевых осадков и сростков	302

Молоко

Исследование молока под микроскопом	308
Белки молока	309
Ферментативное свертывание казеиногена пепсином	310
Реакции на молочный сахар	311
Обнаружение молочной кислоты в кислом молоке	312
* Реакция Умикова на отличие женского молока от коровьего	313
Определение удельного веса молока	314
Определение кислотности молока	315
* Количественное определение жира в молоке	316
* Количественное определение белков в молоке	319
Приложение	321
Приготовление реактивов	321
Таблицы I — XII	335— 344

Збарский Борис Ильич
Збарский Илья Борисович
Солнцев Александр Иванович

Практикум по биологической химии

* * *

Редактор Б. Н. Степаненко
Техн. редактор К. К. Сенчило
Корректор О. В. Соколова
Переплет художника А. В. Петрова

Сдано в набор 31/III 1954 г. Подписано к печати 3/VII 1954 г.
Формат 84×108¹/₃₂ 5,44 бум. л. 17,83 печ. л. + 0,20 печ. л.
(вкл.). 18,05 уч.-изд. л. Тираж 40000 экз. Т 04292. МУ-21.

Медгиз, Москва, Петровка, 12.

Заказ 316. 1-я типография Трансжелдориздата МПС
Москва, Б. Переяславская ул., д. 46
Цена 5 р. 50 к. Переплет 1 руб.

ПРЕДИСЛОВИЕ КО ВТОРОМУ ИЗДАНИЮ

Первое издание Практикума по биологической химии, вышедшее в 1949 г., в настоящее время разошлось.

Авторы получили от преподавателей и студентов ряд отзывов, замечаний и предложений относительно нового издания Практикума. В полученных отзывах высказывались пожелания о некотором расширении пособия и дополнении его новыми работами.

Настоящее издание Практикума по биологической химии полностью пересмотрено и исправлено с учетом полученных замечаний и пожеланий. Введены также новые методики, расширяющие возможность выбора практических занятий. Некоторые добавленные методики могут быть использованы для работы аспирантов и для занятий в студенческих кружках.

Авторы выражают глубокую благодарность всем, приславшим отзывы и замечания по поводу Практикума.

А в т о р ы

ПРЕДИСЛОВИЕ К ПЕРВОМУ ИЗДАНИЮ

При составлении настоящего Практикума по биологической химии авторы прежде всего стремились к тому, чтобы подбор практических работ соответствовал требованиям программы и учебному плану медицинских вузов.

Внимание авторов было также направлено на то, чтобы практические работы могли быть выполнены в течение 3—4 часов, обычно отводимых для занятий. Кроме того, учтена была возможность выполнения работ с помощью доступного оборудования и с минимальным количеством реактивов.

Однако некоторые работы в силу своего объема не могут быть выполнены в 3—4 часа. Эти работы составлялись с таким расчетом, чтобы их можно было закончить в течение двух занятий с перерывом.

В основу Практикума положен многолетний опыт преподавания биологической химии в I Московском медицинском институте под руководством профессоров А. Д. Булыгинского, В. С. Гулевича и Б. И. Збарского. Частично использован опыт преподавания и некоторых других вузов.

Краткие теоретические сведения, перечень приборов и реактивов, а также подробное описание манипуляций имеют целью помочь студенту по возможности самостоятельно, без помощи преподавателя, выполнить каждое практическое занятие.

При проведении практических занятий необходимо, чтобы студент отмечал в рабочей тетради произведенные в ходе работы наблюдения.

Выполнение всех работ, приведенных в Практикуме, требует большего времени, чем это предусматривается учебным планом. Это обстоятельство дает возможность выбора работ. Работы, хотя и важные, но не имеющие основного значения для усвоения курса, а также требую-

щие длительного времени для проведения, отмечены звездочками.

При прохождении практического курса биологической химии весьма желательно, чтобы каждый студент выполнял задания по возможности самостоятельно. При недостаточном количестве оборудования или животных работы могут выполняться группой студентов.

Авторы будут весьма признательны преподавателям, учащимся и всем, кто укажет недостатки настоящего Практикума и желательные в нем изменения.

А в т о р ы

Москва

Кафедра биологической химии
имени акад. В. С. Гулевича
Московского ордена Ленина
медицинского института

Белки
всех жирных
ную массу
животных.

Это очен
ные с
в колло
стоит из ос
собой пе
специфичес

09

лотами или
(распаду с
ных продук
лизе — а м

Облада
и основны
амфотер
как кисло
характерно
щелочных
амфотерно
рН раство
точки
нее устойчи

Структ
мягкая об
в результа
зико-хими

Реакции
в нем тех
физикс

¹ Нали
впервые ус

ХИМИЯ БЕЛКОВ

Белки — важнейшая и необходимая составная часть всех живых клеток и организмов. Они составляют главную массу сухого вещества тканей человека и почти всех животных.

Это очень сложные, высокомолекулярные соединения, находящиеся в организме в коллоидном состоянии. Молекула белка состоит из остатков аминокислот, соединенных между собой пептидными связями¹. Под действием специфических ферментов, а также при нагревании с кислотами или щелочами белки подвергаются гидролизу (распаду с присоединением воды), давая ряд промежуточных продуктов (пептоны, пептиды), а при полном гидролизе — аминокислоты.

Обладая одновременно кислыми карбоксильными и основными аминными группами, белки являются амфотерными веществами и могут вести себя и как кислоты, и как основания. При определенном pH, характерном для каждого белка, диссоциация кислых и щелочных групп белковой частицы уравнивается, и заряд амфотерного иона белка становится минимальным. Такой pH раствора носит название *изоэлектрической точки* белка. В изоэлектрической точке белок наименее устойчив в растворе.

Структура белковой молекулы очень лабильна, и даже мягкая обработка ведет к денатурации белка, в результате которой изменяются его биологические и физико-химические свойства.

Реакции на присутствие белка основаны на наличии в нем тех или иных химических групп и на его физико-химических свойствах.

¹ Наличие пептидной связи аминокислот в молекуле белка впервые установлено А. Я. Данилевским.

Некоторые реакции присущи не только белкам, но и другим веществам, содержащим те же группы. Так, ряд цветных реакций на белок является по существу реакциями на ту или иную аминокислоту, входящую в состав белка. Поэтому для установления наличия белка недостаточно какой-нибудь одной реакции.

В медицинской практике с диагностической точки зрения важно определить белок в моче, а в некоторых случаях также в спинномозговой жидкости и крови.

Белки разделяют на две главные группы: протеины, или простые белки, не содержащие небелковых групп, и протеиды, или сложные белки, содержащие, помимо собственно белка, еще и небелковую (простетическую) группу.

Среди простых белков животного происхождения чаще всего приходится встречаться с альбуминами и глобулинами.

Альбумины растворимы в воде, осаждаются при насыщении раствора сернокислым аммонием, обычно не содержат аминокислоты — глицина. Примерами альбуминов являются альбумины кровяной сыворотки, молока, яичного белка.

Глобулины нерастворимы в воде, но растворимы в присутствии нейтральных солей; осаждаются в полунасыщенном растворе сернокислого аммония, т. е. при добавлении к раствору белка равного объема насыщенного раствора этой соли. К глобулинам относят глобулины сыворотки крови и молока, куриного яйца и др.

Среди сложных белков следует отметить: хромопротеиды — соединения белка с пигментом, например, гемоглобин; нуклеопротеиды — соединения белка с нуклеиновыми кислотами; фосфопротеиды — белки, содержащие фосфор, например, казеин; мукопротеиды (гликопротеиды) — соединения белка со сложными углеводами — мукополисахаридами, например, муцин слюны (простые углеводные группировки содержатся почти во всех белках).

ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА БЕЛКИ

Присутствие белка можно обнаружить рядом цветных реакций. Эти реакции свойственны составным

частям белка —
звучным и м
тиды, а также есс
реакцию, х
связей. Все
скрашивание (сб
гидрином
молекулы вос
кислоту (же
цвета).

Некотор
тофан, фенилала
остатки (наприм
терные цве
ной аминокисло
В большинст
акций можно
ненты.

В щелочной
фиолетово
комплексное со
—CO—NH—. Б
дуктами неполн
пептидами.
Свое назван
изводного моч
реакцию. Биур
с отщеплением

частям белка — аминокислотам или образующим ими группировкам. Так, полипептиды, а также все пептоны и белки дают биуретовую реакцию, характерную для наличия пептидных связей. Все аминокислоты, полипептиды и белки дают окрашивание (обычно фиолетовое) при нагревании с нингидрином. Дикетопиперазиновые группы белковой молекулы восстанавливают пикриновую кислоту (желтого цвета) в пикраминую (красного цвета).

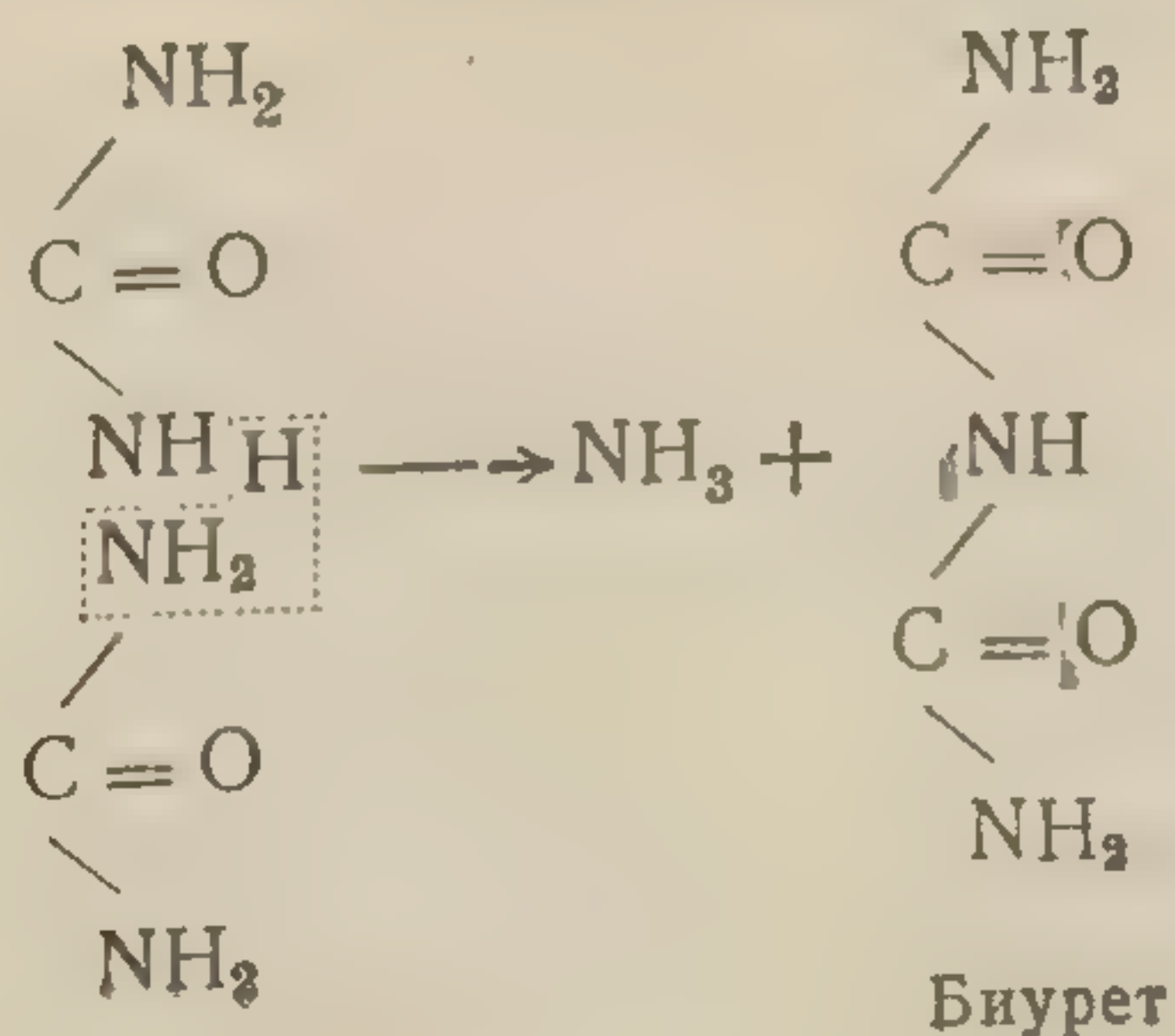
Некоторые аминокислоты (тирозин, триптофан, фенилаланин, цистин, аргинин, гистидин) и их остатки (например, в молекуле белка) дают характерные цветные реакции, свойственные данной аминокислоте.

В большинстве белков при помощи чувствительных реакций можно обнаружить углеводные компоненты.

1. Биуретовая реакция

В щелочной среде в присутствии солей меди белки дают фиолетовое окрашивание. Окраску дает комплексное соединение меди с пептидными группами: $—CO—NH—$. Биуретовая реакция получается также с продуктами неполного гидролиза белка — пептонами и полипептидами.

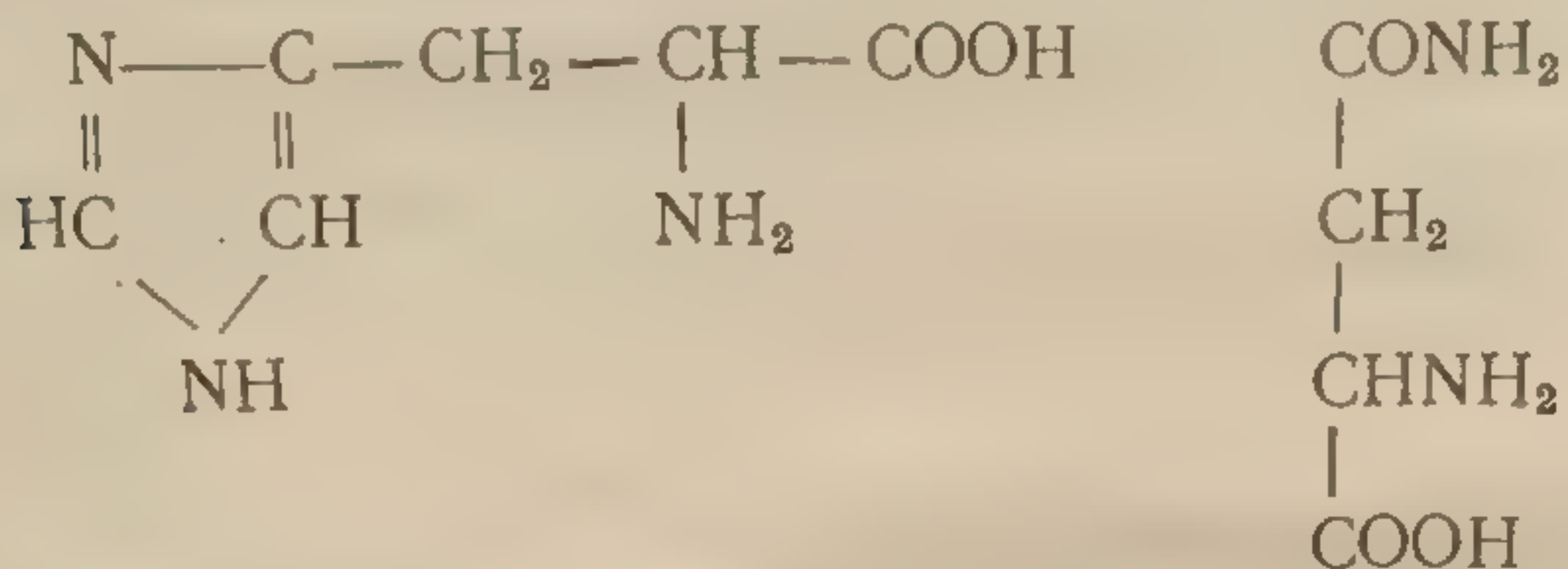
Свое название биуретовая реакция получила от производного мочевины — биурета, который дает эту реакцию. Биурет образуется при нагревании мочевины с отщеплением от нее аммиака:



Цвет комплекса, получаемый при биуретовой реакции с разными пептидами, несколько различен и зависит, согласно исследованиям Н. И. Гаврилова, от длины пептидной цепи. Пептиды с длиной цепи от четырех аминокислотных остатков и выше образуют красный комплекс, трипептиды — фиолетовый, а дипептиды — синий.

Биуретовая реакция получается также с некоторыми (немногочисленными) соединениями, не содержащими пептидных групп (например, при наличии в молекуле групп $—CS—NH—$ или $=CH—NH—$).

Биуретовую реакцию дают: аминокислота гистидин и амид аспарагиновой кислоты — аспаргин¹.



Гистидин

Аспаргин

Приборы. Штатив с сухими пробирками.

Реактивы. 1. Мочевина в порошке.
 2. Едкий натр, 10% раствор.
 3. Сернокислая медь, 1% раствор.
 4. Раствор белка (приготовление см. стр. 329, п. 35).

Ход работы

Проделывают биуретовую реакцию с биуретом, который предварительно получают из мочевины, а затем с белком.

1. Помещают в сухую пробирку несколько кристалликов мочевины и нагревают на слабом огне. Мочевина сначала плавится. Когда сплавленная масса начнет твердеть, нагревание прекращают и дают пробирке остыть. В результате нагревания из мочевины образуется биурет, а аммиак улетучивается (об этом узнают по запаху).

2. К полученному в пробирке биурету прибавляют около 1 мл раствора едкого натра и взбалтывают. К щелоч-

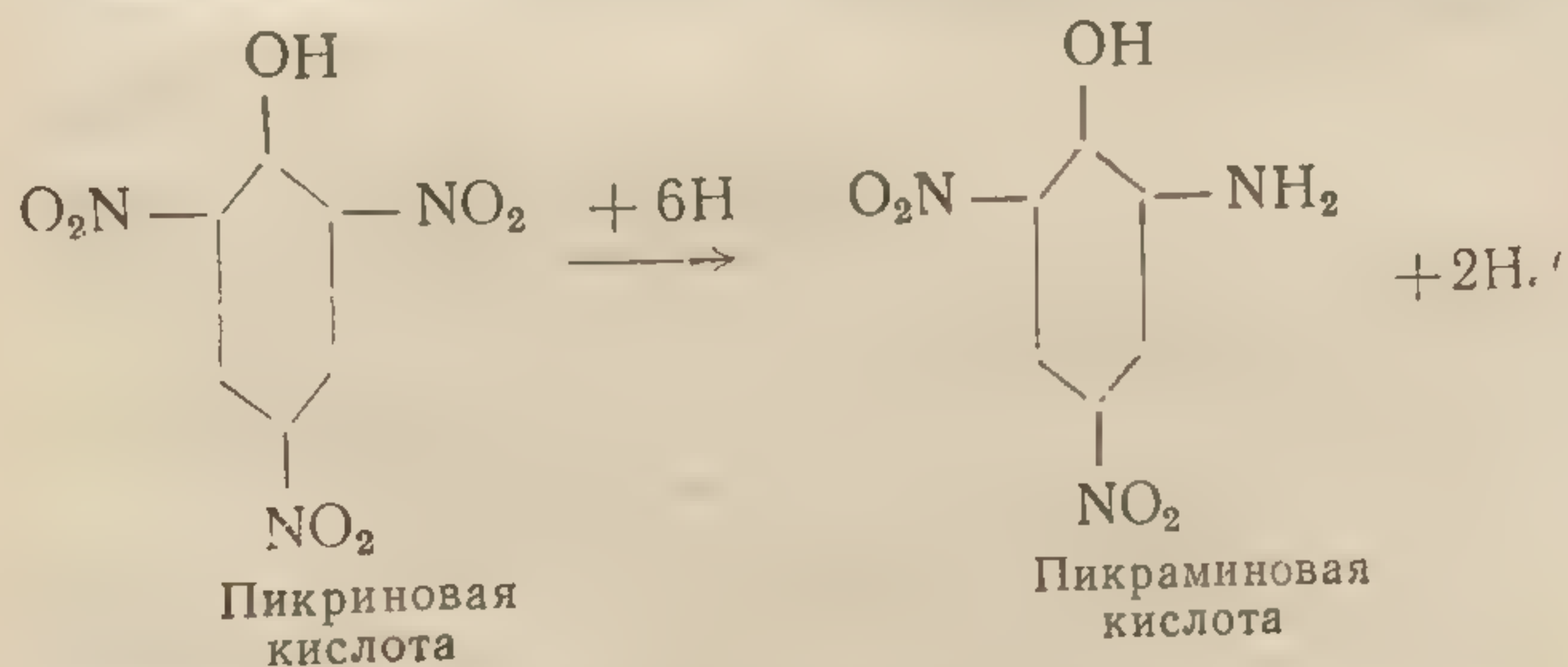
¹ Присутствие аспарагина в организме животных установлено С. Р. Мардашевым.

ному раствору биурета прибавляют 1—2 капли раствора сернокислой меди. При встряхивании получается характерное розоватое окрашивание. Необходимо избегать прибавления избытка раствора сернокислой меди, так как голубая окраска получающегося гидрата окиси меди может маскировать реакцию.

3. Проделывают биуретовую реакцию с раствором белка. В пробирку наливают около 1 мл раствора белка, 1—2 мл раствора едкого натра и 1—2 капли раствора сернокислой меди. При взбалтывании появляется фиолетовое окрашивание.

II. Реакция с пикриновой кислотой

Пикриновая кислота при нагревании с белком в щелочной среде восстанавливается (за счет дикетопиперазиновых группировок)¹ в пикраминовую кислоту (красного цвета). Восстановить пикриновую кислоту в пикраминовую можно также при помощи различных восстановителей, например, глюкозы:



П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.

2. Шпатель.

Р е а к т и в ы. 1. Пикриновая кислота, насыщенный раствор.

2. Раствор белка (приготовление см. стр. 329, п. 35).

3. Глюкоза, 0,1% раствор.

4. Углекислый натрий, сухой.

¹ Наличие дикетопиперазиновых группировок в молекуле белка установлено работами Н. Д. Зелинского, В. С. Садикова и Н. И. Гаврилова.

Ход работы

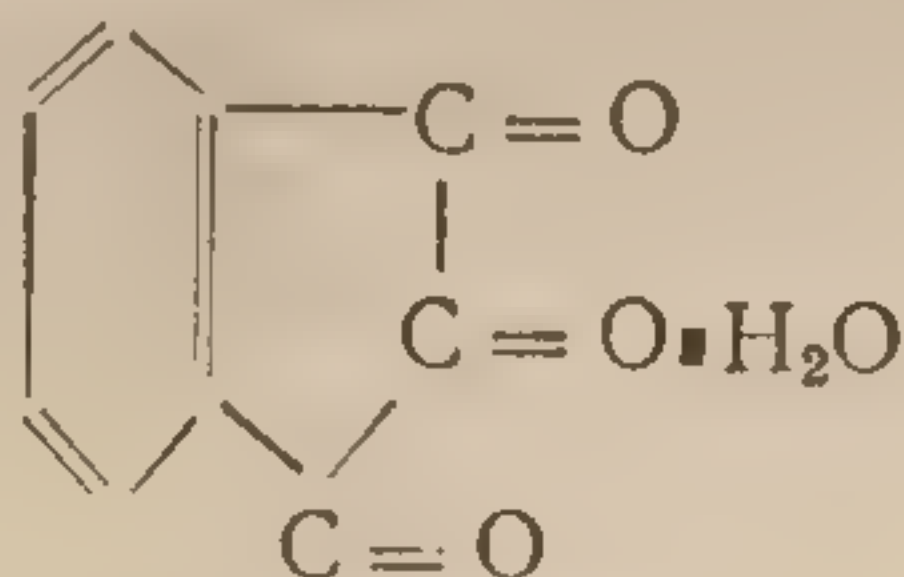
1. В пробирку наливают около 1 мл раствора белка и всыпают 0,2—0,3 г порошка углекислой соды.

2. Добавляют каплю раствора пикриновой кислоты и продолжительно (5—10 минут) кипятят содержимое пробирки. Желтая окраска раствора переходит в красную вследствие восстановления пикриновой кислоты в пикраминую.

3. Прodelывают ту же реакцию с раствором глюкозы вместо белка. Отмечают восстановление пикриновой кислоты в пикраминую (красное окрашивание) за счет глюкозы.

III. Нингидриновая реакция

Белки, а в еще более сильной степени аминокислоты и полипептиды дают синее или фиолетовое окрашивание с нингидрином (трикетогидринденгидратом). Нингидриновая реакция характерна для аминокислот в α -положении.



Нингидрин
(трикетогидринденгидрат)

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. 1. Нингидрин, 0,2% раствор в спирте.
2. Раствор белка (приготовление см. стр. 329, п. 36).
3. Глицин (гликокол), 0,1% раствор.

Ход работы

1. Прodelывают реакцию с какой-нибудь аминокислотой, например, с глицином. Наливают в пробирку около 1 мл раствора глицина, добавляют 5—6 капель раствора нингидрина и нагревают. Появляется фиолетово-синее окрашивание.

2. Так же производят нингидриновую реакцию с 1—2 мл раствора белка, взяв 0,3—0,5 мл раствора нингидрина. Получается фиолетовое (иногда фиолетово-розовое) окрашивание; с течением времени раствор **синеет**.

IV. Ксантопротеиновая реакция

Подавляющее большинство белков (протеинов) при нагревании с крепкой азотной кислотой дает желтое окрашивание, переходящее в оранжевое при добавлении щелочи или аммиака. По-гречески «ксантос» — желтый, откуда реакция и получила название ксантопротеиновой. Такое желтое окрашивание можно наблюдать при попадании крепкой азотной кислоты на кожу, ногти, шерсть и т. п. Эта реакция характерна для бензольного ядра циклических аминокислот (тирозина и триптофана)¹, которые содержатся почти во всех белках. При действии крепкой азотной кислоты на эти аминокислоты происходит нитрование бензольного кольца с образованием нитросоединений желтого цвета.

Ксантопротеиновую реакцию, помимо белков, дают также многие более простые ароматические соединения (например, карболовая кислота).

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. 1. Фенол, 0,1% раствор.

2. Азотная кислота концентрированная.

3. Раствор белка (приготовление см. стр. 329, п. 35).

4. Аммиак или едкий натр, 20% раствор.

Ход работы

1. Проделывают реакцию сначала с фенолом (карболовой кислотой). Наливают в пробирку около 1 мл раствора карболовой кислоты и прибавляют около 1 мл концентрированной азотной кислоты. При нагревании (осторожно!) появляется желтое окрашивание.

¹ Фенилаланин $C_6H_5CH_2CH(NH_2)COOH$ трудно нитруется и, повидимому, не обуславливает ксантопротеиновой реакции.

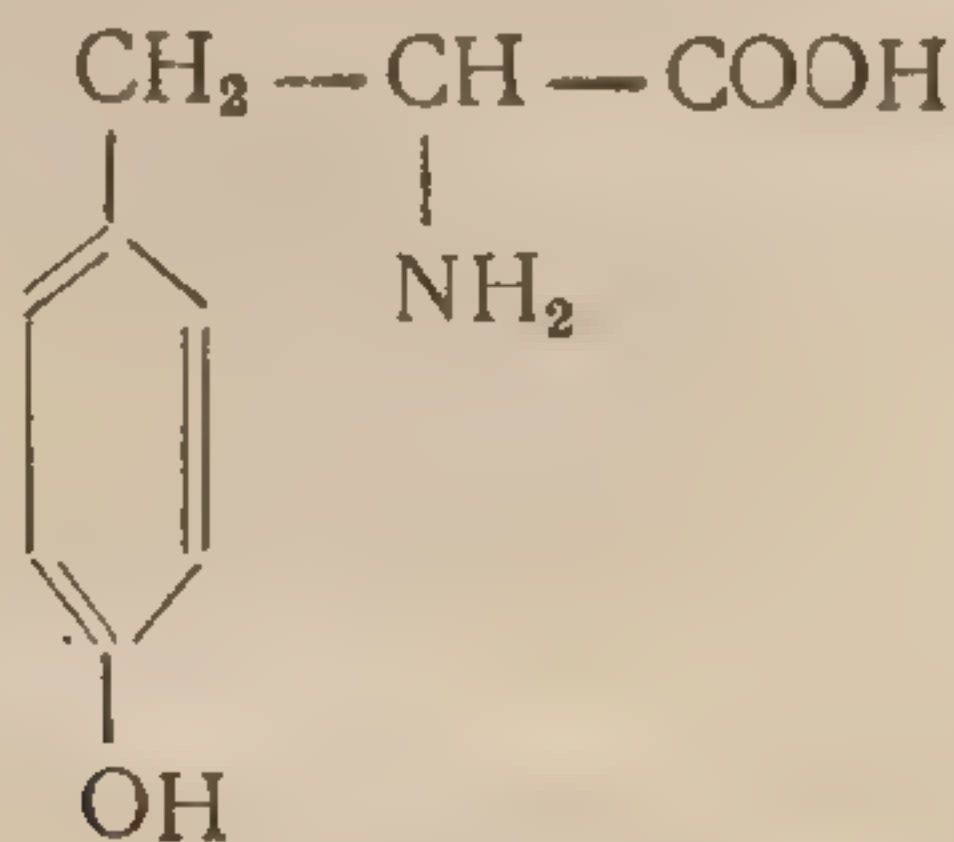
2. Проделывают ксантопротеиновую реакцию с раствором белка. Наливают в пробирку около 1 мл раствора белка и прибавляют 5—6 капель концентрированной азотной кислоты. Появляется осадок свернувшегося (под влиянием кислоты) белка, который и окрашивается при подогревании (осторожно!) в желтый цвет.

Дают пробирке охладиться и осторожно прибавляют избыток аммиака или едкого натра. Желтая окраска при подщелачивании переходит в оранжевую.

V. Реакция Миллона

Фенолы, например, карболовая кислота, и их производные дают ртутные соединения красного цвета. Эти соединения получают при нагревании со специально приготовленным раствором ртути в азотной кислоте, содержащей азотистую кислоту.

Большинство белков дает миллонову реакцию, так как в их состав входит аминокислота тирозин, являющаяся одновременно фенолом.



Тирозин

Белки, не содержащие тирозина — желатин, протамины и др., — не дают миллоновой реакции.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. 1. Фенол, 0,1% раствор.

2. Реактив Миллона (приготовление см. стр. 331, п. 46).

3. Раствор белка (приготовление см. стр. 329, п. 35).

4. Желатин, 1% раствор.

Ход работы

1. Сначала проделывают реакцию с карболовой кислотой (фенолом). Наливают в пробирку около 1 мл раствора карболовой кислоты, прибавляют около 0,5 мл реактива Миллона и осторожно нагревают. Появляется розовое окрашивание.

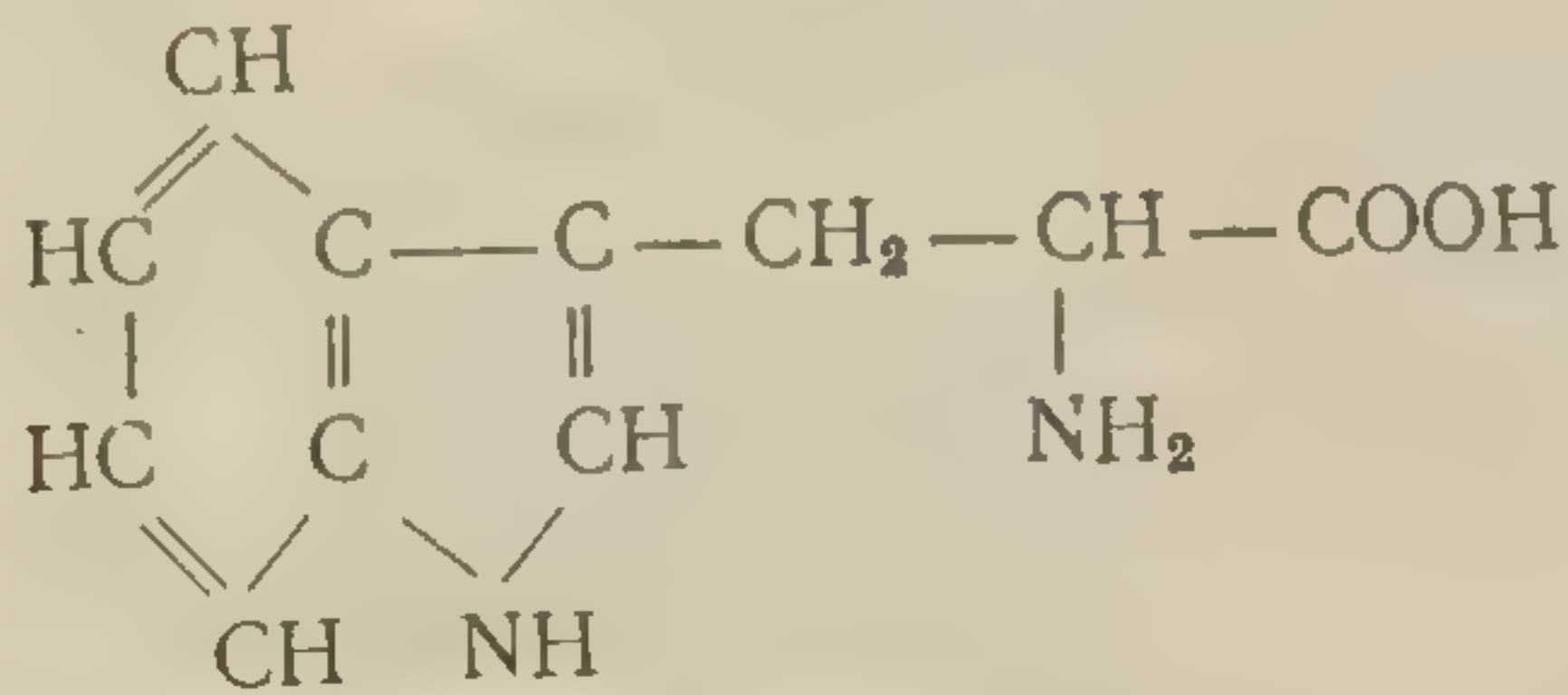
2. Проводят миллонову реакцию с раствором белка. В пробирку наливают 1—2 мл раствора белка и прибавляют 5—6 капель реактива Миллона. Появляется осадок свернувшегося белка, так как реактив Миллона содержит соли ртути и азотную кислоту. Содержимое пробирки осторожно нагревают. Осадок окрашивается в кирпично-красный цвет.

Следует избегать прибавления избытка реактива Миллона, так как этот реактив содержит азотную кислоту, которая может дать желтое окрашивание (ксантопротеиновую реакцию), маскирующее реакцию Миллона.

3. Проводят аналогичным образом миллонову реакцию с раствором желатина. Если желатин достаточно чист, реакция не получается, так как в молекуле желатина остаток тирозина отсутствует.

VI. Реакция Адамкевича

При прибавлении к белку нескольких капель глиоксимо-
ловой кислоты ($\text{H} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{OH}$) на границе с крепкой серной кислотой получается красно-фиолетовое окрашивание. Эта реакция зависит от присутствия в молекуле белка триптофана.



Триптофан

Приборы. Штатив с пробирками.

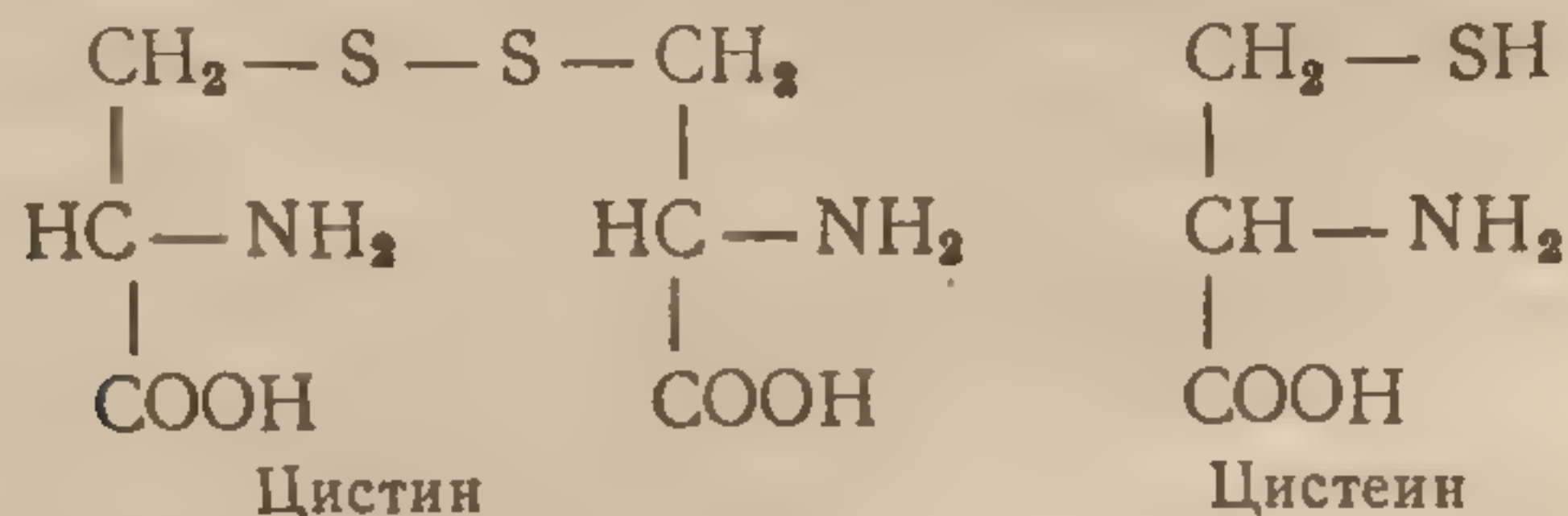
- Р е а к т и в ы.**
1. Бeлoк куриного яйца неразбавленный.
 2. Уксусная кислота концентрированная (в ней в виде примеси всегда содержится глиоксиловая кислота).
 3. Серная кислота концентрированная.

Х о д р а б о т ы

Наливают в пробирку несколько капель белка, прибавляют около 1 мл концентрированной уксусной кислоты и, сильно наклонив пробирку, очень осторожно, по стенке, подслаивают около 1 мл концентрированной серной кислоты так, чтобы обе жидкости не смешались. При стоянии на границе двух жидкостей получается красно-фиолетовый кружок (кольцо).

VII. Реакция на серу (цистина и цистеина) в белках

В состав молекулы большинства белков входят содержащие серу аминокислоты — цистин и цистеин.



Под действием щелочи эти аминокислоты легко отщепляют серу в виде сероводорода. Поэтому почти все белки дают положительную реакцию на слабо связанную серу.

Реакция состоит в том, что при кипячении белка с крепкой едкой щелочью и уксусносвинцовой солью раствор начинает темнеть. Едкая щелочь разрушает цистин и цистеин и отщепляет серу от белка в виде сероводорода, который со свинцовой солью дает черный осадок сернистого свинца.

П р и б о р ы. Штатив с пробирками.

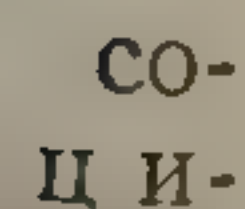
- Р е а к т и в ы.**
1. Уксуснокислый свинец, 0,5% раствор.
 2. Едкий натр, 20% раствор.
 3. Бeлoк куриного яйца неразбавленный.

aB^- aB^-

при-
кисло-
о, по
і сер-
При
асно-

СО-
ЦИ-

при-
кисло-
о, по
і сер-
При
асно-



СО-
ЦИ-

цеп-
елки
еру.
реп-
твор
ци-
ко-
р к

цеп-
елки
еру.
реп-
твор
ци-
ко-
р к

- цеп-
елки
еру.
реп-
твор
ци-
ко-
р к

цеп-
елки
еру.
реп-
твор
ци-
ко-
р к

цеп-
елки
еру.
реп-
твор
ци-
ко-
р к

цеп-
елки
еру.
реп-
твор
ци-
ко-
р к

цеп-
елки
еру.
реп-
твор
ци-
ко-
р к

IX. Диазореакция

Белки дают оранжево-красное окрашивание с диазореактивом. Окраска зависит от образования окрашенных азосоединений с остатками аминокислот — тирозина, триптофана и гистидина, входящими в состав белковой молекулы. Диазореакция используется для качественного и количественного определения тирозина и гистидина в белковых гидролизатах и других объектах.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. 1. Диазореактив (приготовление см. стр. 323, п. 14).

2. Тирозин, 0,01% раствор в 0,1 н. серной кислоте.

3. Раствор белка (приготовление см. стр. 329, п. 35).

4. Углекислый натрий, 10% раствор.

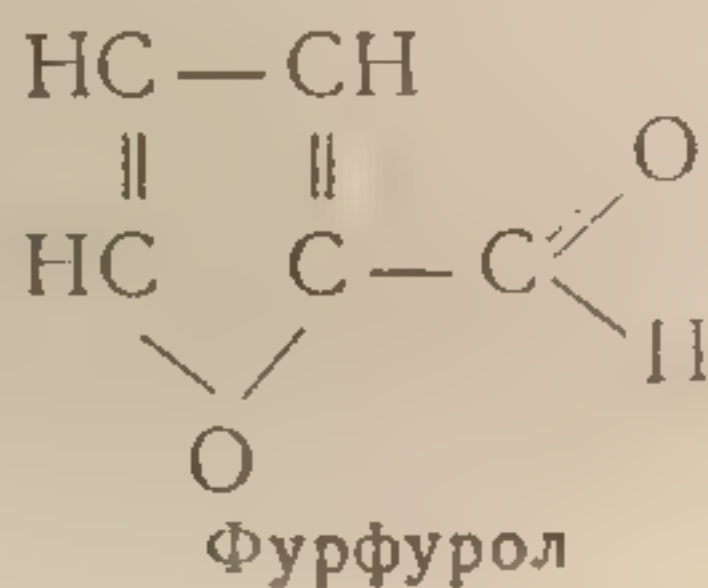
Ход работы

1. Наливают в пробирку 1—2 мл раствора тирозина, 0,3—0,5 мл раствора соды и около 1 мл диазореактива. Появляется оранжево-красное окрашивание.

2. Проделывают ту же реакцию с раствором белка, беря его вместо раствора тирозина. Получается оранжево-красное окрашивание.

X. Реакция на присутствие углеводных компонентов

Почти все белки содержат в своем составе углеводные компоненты. Благодаря этому большинство белков, как показали Баллас и Подобедов, в присутствии концентрированной серной кислоты дают характерное для углеводов фиолетовое окрашивание с α -нафтолом (реакция Молиша) или красное окрашивание с тимолом. Окраску с нафтолом или тимолом дают фурфурол и его производные, которые образуются из углеводов под действием концентрированной серной кислоты.



Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. 1. α -нафтол, 0,2% раствор (приготовление см. стр. 327, п. 26).

2. Тимол, 1% раствор в спирте.

3. Серная кислота концентрированная.

4. Свекловичный сахар, 0,1% раствор.

5. Раствор белка (приготовление см. стр. 329, п. 35).

Ход работы

1. Наливают в две пробирки по 1—2 мл раствора сахара, добавляют в первую пробирку 5—6 капель раствора α -нафтола, а в другую пробирку — 5—6 капель раствора тимола.

2. Осторожно подслаивают в обе пробирки по 1—2 мл концентрированной серной кислоты. Наблюдают фиолетовое (в случае α -нафтола) и красное (в случае тимола) окрашивание на границе раздела серной кислоты и раствора сахара.

3. Прodelывают те же реакции, взяв вместо раствора сахара раствор белка.

Отмечают положительную реакцию, указывающую на наличие углеводных групп в белке.

РЕАКЦИИ ОСАЖДЕНИЯ БЕЛКОВ

Белки могут быть легко выделены из растворов в виде осадков. Реакции осаждения белков весьма разнообразны, однако их можно разделить на две группы.

Первая группа состоит из обратимых реакций осаждения. При этих реакциях осажденные белки не подвергаются глубоким изменениям и получаемые осадки белков снова могут быть растворены в первоначальном растворителе. Молекула белка при этом в основном сохраняет свои первоначальные, так называемые нативные, свойства и не подвергается заметной денатурации.

Вторая группа состоит из необратимых реакций осаждения, т. е. таких, когда белки претерпевают глубокие изменения и не могут быть вновь растворены в первоначальном растворителе. В этом случае имеет место денатурация белка. Денатурацией называют такое изменение белка, при котором он утрачивает свои

нативные биологические и физико-химические свойства, становится менее гидрофильным и обычно теряет способность растворяться в первоначальном растворителе.

К обратимым реакциям осаждения следует отнести большинство реакций высаливания белков, а также осаждение их спиртом или ацетоном при непродолжительном действии этих реактивов на белок при низкой температуре.

К необратимым реакциям осаждения белков относятся: осаждение солями тяжелых металлов, алкалоидными реактивами, кислотами и осаждение при нагревании.

I. Высаливание белков

Белки являются гидрофильными коллоидами, их частицы проявляют значительное сродство к воде. Водная оболочка не дает белковым частицам соединяться вместе и удерживает их в растворе. Другим фактором устойчивости белкового раствора является одноименный (обычно отрицательный) электрический заряд частиц, обуславливающий их взаимное отталкивание.

Если прибавлять к растворам белка соли щелочных и щелочноземельных металлов [обычно пользуются $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , NaCl , MgSO_4], то их ионы, несущие заряд, противоположный заряду белковых частиц, адсорбируются на последних и, делая их электронейтральными (снимая заряд), понижают их устойчивость в растворе. При достаточно большой концентрации солей происходит дегидратация белковых частиц и белки начинают выпадать из раствора.

Такой способ осаждения белков с помощью значительных количеств солей носит название высаливания.

Осадки белков, полученные высаливанием, могут быть вновь растворены после уменьшения концентрации солей диализом или разведением водой. Высаливание белков, следовательно, является обратимым процессом.

Для высаливания различных белков требуется разная концентрация одних и тех же солей. Вот почему белки можно высаливать фракционно.

Концентрированные растворы сернокислого аммония высаливают почти все белки. Некоторые белки, например,

г.б.бу.ин.и.
сернокислым
м.ны. вып.
Хлористый
глобулины
нии (в изоэ
мины не то
низкой кон
магния.

Прибо
Реакт

1. Налив
прибавляют
кислого ам
на сыщел
Выпадает ос
2. Через
мое пробирк
бумин.
3. Для в
тонко измел
щения, т.
останется не

1 Сыворот
белком, к кот
глобулин не в
п. 37).

глобулины, выпадают уже при полунасыщении растворов сернокислым аммонием. Другие белки, например, альбумины, выпадают только при полном насыщении.

Хлористый натрий и сернокислый магний осаждают глобулины при полном насыщении. При слабом подкислении (в изоэлектрической точке) эти соли осаждают и альбумины не только при полном насыщении, но и при более низкой концентрации хлористого натрия и сернокислого магния.

П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.

2. Воронка с фильтром.

Р е а к т и в ы. 1. Сыворотка крови¹.

2. Сернокислый аммоний, насыщенный раствор.

3. Сернокислый аммоний, кристаллический, тонко измельченный.

4. Хлористый натрий, кристаллический, тонко измельченный.

5. Сернокислый магний, кристаллический, тонко измельченный.

6. Уксусная кислота, 1% раствор.

7. Едкий натр, 10% раствор.

8. Сернокислая медь, 1% раствор.

Х о д р а б о т ы

А. Осаждение сернокислым аммонием

1. Наливают в пробирку около 3 мл сыворотки крови, прибавляют равный объем насыщенного раствора сернокислого аммония и перемешивают. Получается **п о л у н а с ы щ е н н ы й р а с т в о р** сернокислого аммония. Выпадает осадок белка — **г л о б у л и н**.

2. Через несколько минут отфильтровывают содержимое пробирки. В фильтрате остается другой белок — **а л ь б у м и н**.

3. Для высаливания альбумина в фильтрат добавляют тонко измельченного сернокислого аммония до **н а с ы щ е н и я**, т. е. до тех пор, пока новая порция порошка останется нерастворенной. Выпадает осадок альбумина.

¹ Сыворотка крови может быть заменена разведенным яичным белком, к которому добавлен хлористый натрий для того, чтобы глобулин не выпадал из раствора (приготовление см. стр. 329, п. 37).

4. Альбумин отфильтровывают.

5. В фильтрате проделывают биуретовую реакцию. Отрицательная реакция указывает на отсутствие белка.

6. Осадок альбумина вместе с фильтром переносят в пробирку и растворяют в 4—5 мл воды, продолжительно взбалтывая пробирку.

7. Раствор альбумина отфильтровывают и производят с ним биуретовую реакцию

Б. Осаждение хлористым натрием и сернокислым магнием

1. В две чистые пробирки наливают приблизительно по 3 мл сыворотки крови.

2. Прибавляют до полного насыщения в одну пробирку тонко измельченного хлористого натрия, в другую — сернокислого магния. Через несколько минут в обеих пробирках появляется осадок г л о б у л и н о в.

3. Содержимое пробирок отфильтровывают. В фильтратах остаются альбумины, которые в нейтральных растворах не выпадают от этих солей даже при полном насыщении.

4. Прибавляют к фильтрату несколько капель разведенной уксусной кислоты; в слабокислой среде выпадают и альбумины.

5. Через несколько минут альбумины отфильтровывают.

6. Проверяют фильтрат на отсутствие белка при помощи биуретовой реакции.

II. Осаждение белков спиртом

Многие органические растворители (спирты, ацетон, эфир и др.) осаждают белки из нейтрального или слабнокислого раствора. Если к водному раствору белка прибавлять, например, этиловый спирт, то можно достигнуть такой концентрации его (неодинаковой для разных белков), когда происходит осаждение белка. Механизм действия спирта объясняют связыванием воды, что ведет к дегидратации мицелл белка и понижению их устойчивости в растворе.

Если при этом присутствует небольшое количество солей (например, хлористого натрия), осадок образуется полнее и быстрее. Ионы соли связываются коллоидными частицами белка и снимают их заряд. Это обстоятельство еще больше снижает устойчивость раствора белка.

Если осаждение производить на холоду и полученный осадок быстро отделить от спирта, то белок может быть вновь растворен в воде, т. е. свойства его в этом случае не

изменяется.
дение обратн
рует и стано
творителя.
Прибав
реакции

1. Помещ
белка, приба
взбалтывают.

2. В проб
литров эти
несколько ми

III. Оса

Белки из
металлов (сви
с ними прочн
В отличие от
земельных ме
таллов требу
В случае при
лой меди изб
зованного им
сорбцией изб
комплекса, вс
измененного б
добавление д
вызывает р с
Белковые оса
металлов, од
ч а л ь н о м
растворах соле
тяжелых мета
циям осажде
Осадки ст
растворимы в

изменяются, денатурация не успевает произойти и осаждение обратимо. При стоянии со спиртом белок денатурирует и становится нерастворимым в первоначальном растворителе.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. 1. Раствор белка для реакций осаждения (приготовление см. стр. 329, п. 36).

2. Этиловый спирт.

3. Хлористый натрий кристаллический.

Ход работы

1. Помещают в пробирку 1—2 мл водного раствора белка, прибавляют щепотку сухого хлористого натрия и взбалтывают.

2. В пробирку постепенно приливают несколько миллилитров этилового спирта и сильно взбалтывают. Через несколько минут выпадает мелкий осадок белка.

III. Осаждение белков солями тяжелых металлов

Белки из растворов легко осаждаются солями тяжелых металлов (свинца, меди, серебра, ртути и др.), образуя с ними прочные солеобразные и комплексные соединения. В отличие от высаливания солями щелочных и щелочно-земельных металлов для осаждения солями тяжелых металлов требуются небольшие концентрации последних. В случае применения уксуснокислого свинца и сернокислой меди избыток этих солей вызывает растворение образованного ими осадка. Такое растворение объясняется адсорбцией избытка ионов металла и перезарядкой белкового комплекса, вследствие чего в раствор переходит комплекс измененного белка с металлом. Благодаря тому же механизму добавление недостаточного количества хлористого натрия вызывает растворение осадка ртутного соединения белка. Белковые осадки, полученные действием солей тяжелых металлов, однако, нерастворимы в первоначальном растворителе, т. е. в воде или слабых растворах солей. Таким образом, осаждение белков солями тяжелых металлов следует отнести к необратимым реакциям осаждения, связанным с денатурацией белка.

Осадки от солей тяжелых металлов, как правило, нерастворимы в первоначальном растворителе даже после

удаления солей диализом или разбавления водой. Свойством белков связывать тяжелые металлы пользуются в медицинской практике, употребляя белки (молоко, яйца) как противоядие при отравлении солями ртути (сулема), свинца (от недоброкачественности полуды) или меди (от окисленной медной посуды), пока эти соли еще не успели всосаться.

Реакции осаждения белков солями тяжелых металлов идут обычно полно (особенно в присутствии солей щелочных металлов) и ими пользуются не только для выделения белков из растворов, но и для освобождения жидкостей от белков.

П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.
2. Стекланные палочки.

Р е а к т и в ы. 1. Раствор белка для реакций осаждения (приготовление см. стр. 329, п. 36).
2. Уксуснокислый свинец, 0,5% раствор.
3. Сернокислая медь, 5% раствор
4. Азотнокислое серебро, 3% раствор.
5. Сулема, 0,5% раствор.
6. Хлористый натрий, насыщенный раствор.

Х о д р а б о т ы

1. В четыре пробирки наливают по 1—2 мл раствора белка.

2. Прибавляют по каплям в первую пробирку раствор уксуснокислого свинца, во вторую — раствор сернокислой меди, в третью — раствор азотнокислого серебра и в четвертую — раствор сулемы (осторожно, яд!). Наблюдается образование осадков во всех четырех пробирках.

3. В пробирки с осадками от уксуснокислого свинца и от сернокислой меди добавляют избыток этих солей. Наблюдается растворение осадков.

4. В пробирку с осадком от сулемы добавляют 7—8 капель насыщенного раствора хлористого натрия. Наблюдают растворение осадка.

IV. Осаждение белков алкалоидными реактивами

Растворы белков могут образовывать осадки при добавлении так называемых алкалоидных реак-

т и в о в. К последним относятся: таннин, пикриновая кислота, $H_4[Fe(CN)_6]$, соли $KJ \cdot HgJ_2$ и $KJ \cdot BiJ_3$ и некоторые другие вещества. Эта способность белков к осаждению алкалоидными реактивами объясняется наличием сходных азотистых группировок как в белках, так и в алкалоидах.

Механизм осаждения алкалоидными реактивами заключается в образовании нерастворимых солей различных соединений с основными азотистыми группами. В этом соединении белок является катионом, а алкалоидный реактив — анионом. Вследствие этого осаждение белков алкалоидными реактивами необходимо производить в кислой среде (частицы белка перезаряжаются и переходят в состояние катионов).

В щелочной среде осадки растворяются.

П р и б о р ы. Штатив с пробирками.

Р е а к т и в ы. 1. Раствор белка для реакций осаждения (приготовление см. стр. 329, п. 36).

2. Пикриновая кислота, насыщенный раствор.

3. Таннин, насыщенный раствор.

4. Уксусная кислота, 1% раствор.

5. Уксусная кислота, 10% раствор.

6. Иодная ртуть в иодистом калии (приготовление см. стр. 329, п. 40).

7. Железистосинеродистый калий, 5% раствор.

Х о д р а б о т ы

1. В две пробирки наливают по 1—2 мл раствора белка и подкисляют их 2—3 каплями 1% раствора уксусной кислоты.

2. В одну пробирку прибавляют 2—3 капли раствора таннина, в другую — 5—6 капель раствора пикриновой кислоты. Наблюдают выпадение белка в осадок.

3. В третью пробирку наливают 1—2 мл раствора белка, подкисляют 2—3 каплями 10% раствором уксусной кислоты и добавляют 2—3 капли раствора железистосинеродистого калия, взбалтывая после добавления каждой капли. Белок выпадает в осадок.

4. В четвертую пробирку наливают 1—2 мл раствора белка, подкисляют 2—3 каплями 1% раствора уксусной кислоты и добавляют 1—2 капли раствора иодной ртути в иодистом калии. Наблюдают выпадение белка в осадок.

V. Осаждение белков минеральными кислотами

Концентрированные минеральные кислоты (кроме H_3PO_4) вызывают необратимое осаждение белков из растворов. Это осаждение объясняется как явлениями дегидратации белковых частиц, так и рядом других причин (например, образованием солей из белка и кислот и др.). Избыток минеральной кислоты, за исключением азотной, растворяет выпавший осадок белка.

Реакция осаждения белков азотной кислотой особенно распространена и часто применяется при клинических исследованиях мочи.

П р и б о р ы. Штатив с пробирками.

Р е а к т и в ы. 1. Соляная кислота концентрированная.
2. Серная кислота концентрированная.
3. Азотная кислота концентрированная.
4. Раствор белка для реакций осаждения (приготовление см. стр 329, п. 3б).

Х о д р а б о т ы

1. В три пробирки осторожно наливают приблизительно по 1 мл кислот: в 1-ю соляной, во 2-ю серной и в 3-ю азотной.

2. Осторожно наливают во все три пробирки приблизительно по 1 мл раствора белка. На границе двух жидкостей наблюдается появление осадка белка в виде небольшого белого кружка (кольца).

3. Осторожно встряхивают каждую пробирку. Происходит растворение осадков в избытке соляной кислоты и в избытке серной кислоты; в пробирке с азотной кислотой осадок не исчезает при встряхивании, так как в избытке азотной кислоты он не растворяется.

VI. Осаждение белков органическими кислотами

Белки из растворов могут осаждаться и органическими кислотами, однако разные органические кислоты неодинаково действуют на белок. Трихлоруксусная кислота CCl_3COOH и сульфосалициловая кислота $\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})(\text{COOH})\text{SO}_3\text{H}$ являются очень чувствительными и специфическими реактивами на белок и широко применяются с этой целью.

Осаждение белков с помощью трихлоруксусной кислоты в конечной концентрации 2,5—5% часто применяется для полного удаления белков из биологических жидкостей (например, из сыворотки крови), так как трихлоруксусная кислота осаждает только белки, а продукты их распада при этом остаются в растворе. Это особенно важно, когда нужно определить отдельно содержание азота белка и азота более низкомолекулярных продуктов (аминокислот, мочевины и др.) — так называемый «остаточный азот».

В том случае, если после осаждения белков требуется из фильтрата удалить трихлоруксусную кислоту, то это достигается кипячением фильтрата, в результате чего трихлоруксусная кислота разлагается на хлороформ и угольный ангидрид, которые улетучиваются.

П р и б о р ы. Штатив с пробирками.

Р е а к т и в ы. 1. Трихлоруксусная кислота, 3% раствор.
2. Сульфосалициловая кислота, 20% раствор.
3. Раствор белка для реакций осаждения (приготовление см. стр. 329, п. 36).

Х о д р а б о т ы

1. В пробирку наливают 1—2 мл раствора белка и добавляют несколько капель раствора трихлоруксусной кислоты. Наблюдают выпадение осадка белка.

2. В другую пробирку наливают 1—2 мл раствора белка и добавляют несколько капель раствора сульфосалициловой кислоты. Наблюдают выпадение осадка белка.

VII. Осаждение белков при нагревании

Почти все белки свертываются при нагревании. Температура свертывания различна для разных белков, и если одни белки коагулируют уже при 50—55°, то некоторые из них выдерживают даже непродолжительное кипячение.

При свертывании белки денатурируют и переходят в нерастворимое состояние. Механизм тепловой денатурации связан с перестройкой структуры белковой молекулы, в результате которой белок теряет свои нативные свойства и растворимость. Реакция денатурации протекает постепенно и ускоряется с повышением температуры; поэтому слишком кратковременное нагревание может и не привести к свертыванию.

Присутствие солей и концентрация водородных ионов играют важную роль в свертывании белков при нагревании.

Наиболее полная и быстрая коагуляция имеет место в изоэлектрической точке, т. е. при таком pH, когда коллоидные частицы белка теряют свой электрический заряд и становятся наименее устойчивыми в растворе. Для большинства белков изоэлектрическая точка соответствует слабокислой реакции (pH около 5,0).

В сильно кислых растворах белковые мицеллы перезаряжаются и несут положительный заряд, что повышает их устойчивость. Подобно этому в щелочных растворах стабильность белкового коллоида обусловлена отрицательным зарядом частиц. Поэтому в сильно кислых и щелочных растворах белки обычно не выпадают при нагревании. В сильно кислых растворах белки при нагревании могут коагулировать лишь при добавлении достаточного количества какой-либо нейтральной соли.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. 1. Раствор белка для реакций осаждения (приготовление см. стр. 329, п. 36).

2. Уксусная кислота, 1% раствор.

3. Уксусная кислота, 10% раствор.

4. Хлористый натрий, насыщенный раствор.

5. Едкий натр, 10% раствор.

1. Нагреть
раствора бел
2. Нагреть
осадок белка
3. Добавл
ной кислоты
и полное во
электри
4. Добавл
уксусной к
даже при к
5. Добав
уксусной к
хлористого
6. Добав
едкого натр
при кипяче
Чувствит
висит от ха
и ряда дру
тельности к
обычно счит
1 часть бел
центрирован
стях; желез
фосалицило
нином, иодн
с уксусной к
в 100 000 ча

Диализ
молекулярн
с помощью
чески непр
Белки
белковых ча
полупро
ством белка
кулярных п

Ход работы

1. Наливают в 5 пробирок приблизительно по 2 мл раствора белка.

2. Нагревают содержимое первой пробирки. Образуется осадок белка.

3. Добавляют во вторую пробирку каплю 1% уксусной кислоты и нагревают. Осадок белка выпадает скорее и полнее вследствие того, что белок находится в изоэлектрической точке.

4. Добавляют в третью пробирку около 0,5 мл 10% уксусной кислоты и нагревают. Осадка белка не образуется даже при кипячении.

5. Добавляют в четвертую пробирку около 0,5 мл 10% уксусной кислоты, несколько капель насыщенного раствора хлористого натрия и нагревают. Образуется осадок белка.

6. Добавляют в пятую пробирку около 0,5 мл раствора едкого натра и нагревают. Осадка белка не образуется даже при кипячении.

Чувствительность качественных реакций на белок зависит от характера белка, находящихся в растворе солей и ряда других причин. Таким образом, пределы чувствительности каждой реакции очень широки. Тем не менее обычно считают, что биуретовой реакцией можно открыть 1 часть белка в 10 000 частях раствора; осаждением концентрированной азотной кислотой — 1 часть в 40 000 частях; железистосинеродистоводородной кислотой или сульфосалициловой кислотой — 1 часть в 50 000 частях; таннином, иодной ртутью в иодистом калии или кипячением с уксусной кислотой в присутствии средних солей — 1 часть в 100 000 частях.

ДИАЛИЗ БЕЛКА

Диализ — это освобождение коллоидов от низкомолекулярных органических и минеральных примесей с помощью диффузии последних через мембраны, практически непроницаемые для коллоидов.

Белки в растворе благодаря значительной величине белковых частиц не диффундируют сквозь полупроницаемую мембрану. Этим свойством белка пользуются для его очистки от низкомолекулярных примесей.

Приборы. 1. Диализатор (простейшим диализатором может служить коллодиевый мешочек, опущенный в стакан с дистиллированной водой, рис. 1).

2. Штатив с пробирками.

Реактивы. 1. Раствор белка, содержащий хлористый натрий (приготовление, см. стр. 329, п. 37).

2. Азотнокислое серебро, 1% раствор.

3. Азотная кислота, 10% раствор.

4. Едкий натр, 10% раствор.

5. Сернокислая медь, 1% раствор.

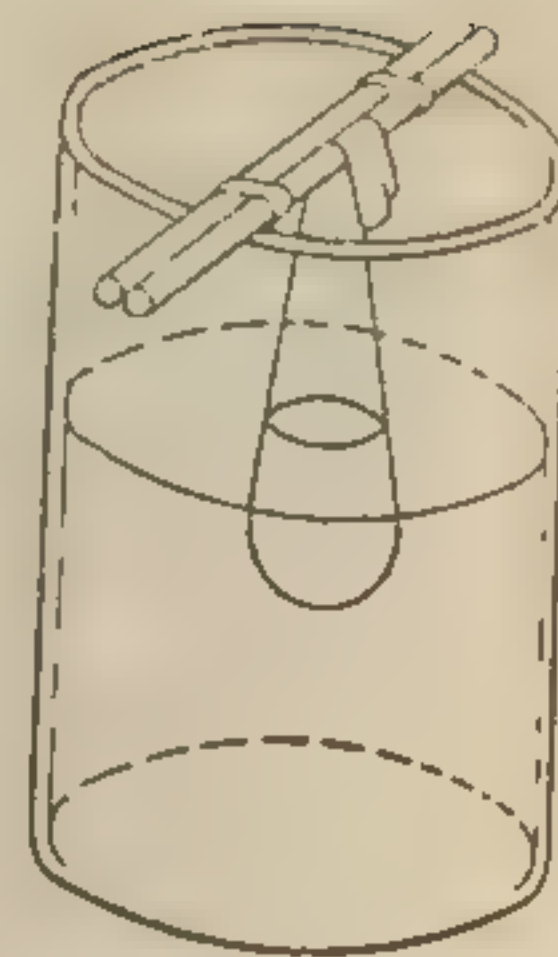


Рис. 1.
Простейший диализатор.

Ход работы

1. Проделывают с раствором белка биуретовую реакцию.

2. Наливают 10—15 мл раствора белка в коллодиевый мешочек и погружают его с помощью деревянных зажимов в стакан с дистиллированной водой таким образом, чтобы открытый край мешочка выступал над поверхностью воды.

3. Приблизительно через час берут из стакана по 1—2 мл воды и убеждаются в наличии там ионов хлора (реакция с азотнокислым серебром в присутствии азотной кислоты) и в отсутствии белка (биуретовая реакция отрицательна)¹.

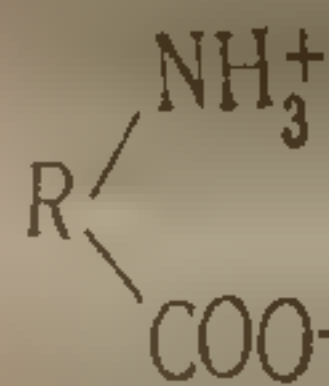
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКИ БЕЛКА

Белки следует рассматривать как вещества, содержащие большое количество кислых и основных групп. Кислотные группировки белка происходят главным обра-

¹ Если менять воду в стакане, то через некоторое время можно заметить появление внутри коллодиевого мешочка слабой мути — осадка глобулина. Это происходит вследствие понижения концентрации хлористого натрия в коллодиевом мешочке. В растворе, бедном солями, глобулины выпадают.

зом за счет
аминокислот.
гидроксиль-
лочные груп-
новым и н
лотно-щелочн
соединения ос
Обладая од
ствами, белки

В щело
роль ани
например, пр
вая соль бел



Биполярны
ион белка

В кис
лок и гра
ляной кислот
теин-хлорид)



Бипо
ион

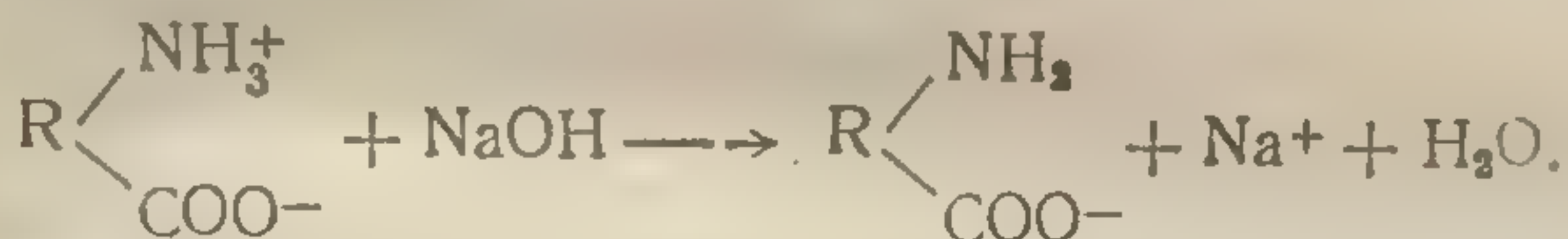
Таким обр
ка как анион
ция в вод
лая среда) у
реводит его
наоборот, по
белковые ча

зом за счет карбоксильных групп дикарбоновых аминокислот. Кислую реакцию дают также фенольные гидроксилы и сульфгидрильные группы. Щелочные группы белка обязаны аминным, гуанидиновым и иминным группам диаминокислот. На кислотно-щелочные свойства белка влияет также характер соединения остатков аминокислот в белковой молекуле.

Обладая одновременно кислотными и основными свойствами, белки образуют биполярные ионы:



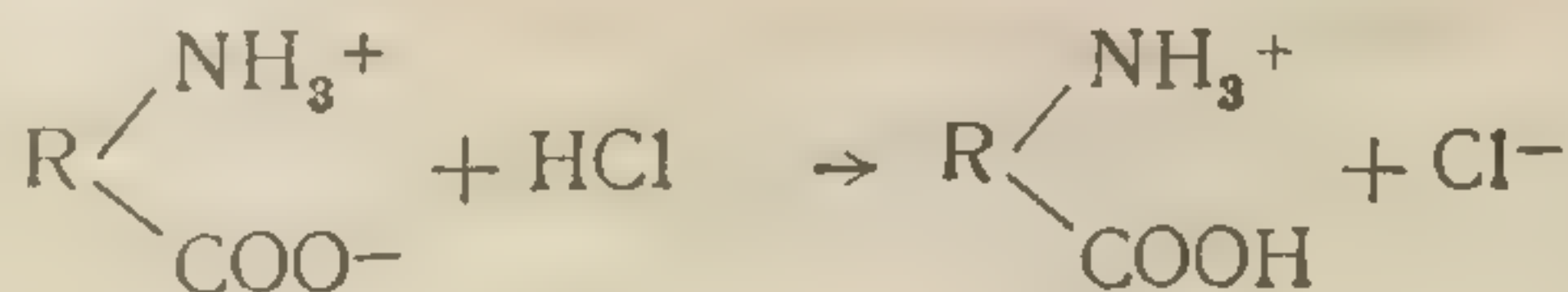
В щелочных растворах белок играет роль аниона. При потере протона из группы —NH_3^+ , например, при действии едкого натра, образуется натриевая соль белка (протеинат натрия);



Биполярный
ион белка

Анион
белка

В кислых растворах, наоборот, белок играет роль катиона; например, с соляной кислотой получается хлористоводородная соль (протеин-хлорид):



Биполярный
ион белка

Катион
белка

Таким образом, фактором, определяющим поведение белка как аниона или как катиона, является концентрация водородных ионов. Ее повышение (кислая среда) уменьшает кислотную диссоциацию белка и переводит его в катион; понижение (щелочная среда), наоборот, понижает щелочную диссоциацию и переводит белковые частицы в анионы. Однако при определенном

значении рН (неодинаковом для различных белков) кислотная диссоциация белковой частицы становится равной щелочной — число положительных зарядов амфотерного иона белка сравнивается с числом отрицательных зарядов и заряд белка в целом может стать практически равным нулю.

В этих условиях белок находится в и з о э л е к т р и ч е с к о м состоянии и в электрическом поле не будет обнаруживать передвижения ни к катоду, ни к аноду. рН раствора, при котором белок находится в изоэлектрическом состоянии, называется и з о э л е к т р и ч е с к о й точкой белка.

В изоэлектрической точке белок находится почти целиком в виде амфотерных ионов, несущих равные положительные и отрицательный заряды, тогда как при других концентрациях водородных ионов мы встречаем преимущественно положительные или отрицательные ионы белка.

Растворы белков в изоэлектрической точке наименее устойчивы. В этом случае отталкивание одноименно заряженных частиц, повышающее устойчивость раствора, прекращается и в качестве стабилизирующего фактора действует лишь гидратация (водная оболочка) белка.

Для большинства белков изоэлектрическая точка близка к нейтральной среде, но несколько сдвинута в кислую сторону. Это объясняется тем, что кислотные свойства у них преобладают над щелочными и в нейтральном растворе они реагируют как слабые кислоты. Молекула таких белков содержит больше свободных карбоксильных групп, чем аминных, а при гидролизе дает преобладание дикарбоновых и других кислореагирующих аминокислот над теми, у которых преобладают основные свойства. Некоторые белки, наоборот, относительно богаче аминными группами и в своем составе содержат больше остатков диаминокислот. В нейтральном растворе они ведут себя как слабые основания. Такие белки (например, гистоны и протамины) имеют изоэлектрическую точку при с л а б о щ е л о ч н о й реакции.

Определение изоэлектрической точки белка удобно произвести на примере желатина.

- П р и б о р ы. 1. Штатив с большими пробирками.
2. Пипетка на 2 мл с делениями.
3. Пипетка на 10 мл с делениями.

реакт

1. Приго

раст

CH_3COONa , 0
 CH_3COOH , 0
 CH_3COOH , 1
Дистиллиров
Желатин, 10

2. Взба

3. Приб

в пробирку
время оста
требуется с

4. Во в
нии столы
бирку № 4

5. Наб
обозначаю

рН
Помутнение

При
мутнения

Таким
ка желати
сорта жел
в предела
зателя.

3 Практику

Р е а к т и в ы. 1. Уксуснокислый натрий, 0,1 н. раствор.

2. Уксусная кислота, 0,1 н. раствор.

3. Уксусная кислота, 1 н. раствор.

4. Желатин 1% раствор.

5. Этиловый спирт.

Х о д р а б о т ы

1. Приготавливают следующую серию из шести пробирок.

Растворы	№ пробирки					
	1	2	3	4	5	6
	количество в мл					
CH_3COONa , 0,1 н.	2	2	2	2	2	2
CH_3COOH , 0,1 н.	0,25	0,5	1	2	4	—
CH_3COOH , 1 н.	—	—	—	—	—	0,8
Дистиллированная вода	3,75	3,5	3	2	—	3,2
Желатин, 1%	2	2	2	2	2	2

2. Взбалтывают содержимое пробирок.

3. Прибавляют из пипетки медленно, при помешивании, в пробирку № 4 столько спирта, чтобы спустя некоторое время оставалась едва заметная муть. Обычно для этого требуется около 7 мл.

4. Во все другие пробирки прибавляют при помешивании столько же спирта, сколько было прибавлено в пробирку № 4.

5. Наблюдают через 30 минут помутнение, которое обозначают по следующей схеме:

	№ пробирки					
	1	2	3	4	5	6
pH	5,6	5,3	5,0	4,7	4,4	4,1
Помутнение	—	—	++	+++	+-	—

П р и м е ч а н и е. Числом плюсов обозначена степень помутнения.

Таким образом, в данном случае изоэлектрическая точка желатина соответствует $\text{pH} = 4,7$. В зависимости от сорта желатина изоэлектрическая точка может колебаться в пределах нескольких десятых долей водородного показателя.

КИСЛОТНЫЙ ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ

Белки можно подвергнуть гидролизу, т. е. распаду молекул на более простые составные части с присоединением воды.

Частичный, очень небольшой гидролиз может быть вызван одним нагреванием белка с водой, но глубокого гидролиза можно достигнуть, только катализируя этот процесс нагреванием с кислотами или щелочами или действием ферментов.

В организме гидролиз белка постоянно протекает под действием специфических ферментов и играет важную роль в процессе пищеварения и в белковом обмене.

В лабораторных условиях гидролиз является важнейшим методом исследования белков и производится обычно при помощи кислот или щелочей.

В ходе гидролиза белковая молекула сначала распадается на высокомолекулярные продукты — пептоны, далее на полипептиды, затем на более простые пептиды и, наконец, на аминокислоты¹.

Для полного гидролиза белка часто применяют многочасовое кипячение с обратным холодильником с серной или соляной кислотой².

Признаком полного гидролиза белка обычно служит отрицательная биуретовая реакция гидролизата. Следует, однако, помнить, что этот признак указывает скорее на приближение окончания гидролиза, чем на его завершение, так как некоторые простые пептиды могут не давать фиолетового окрашивания при биуретовой реакции (см. стр. 9). Поэтому после констатирования отрицательной биуретовой реакции на белок гидролиз следует продолжать еще 1—2 часа и только после этого его можно считать законченным.

¹ При кислотном гидролизе белка, помимо аминокислот, обычно получают аммиак, моносахариды, гексозамины, сероводород, гуминовые вещества и некоторые другие соединения.

² Длительное нагревание гидролизата, конечно, невозможно провести во время одного (обычно трехчасового) занятия. Ввиду этого кислотный гидролиз белков сыворотки крови, а также шелка с выделением тирозина (см. ниже) удобнее проводить не в одно занятие, а в два, с тем чтобы гидролиз был закончен в перерыв между студенческими занятиями. Рекомендуются также иметь заранее приготовленный гидролизат, с которым можно закончить работу в то же занятие.

Приб

реакт

1. Нали
ратным хол
15—20 мл

2. Соеди
воду и нагр
продолывая
нейтрализо

3. Прод
чения отри

II. К

Шелк п
ловины ве
фиброи
очень бога
служить
розина.

Выделе
белка и о
ции и охл
Приб

1. Обрат
ная трубка,

1. Гидролиз белков сыворотки крови

П р и б о р ы. 1. Небольшая колбочка с обратным холодильником¹.

2. Штатив с пробирками.

Р е а к т и в ы. 1. Сыворотка крови.

2. Серная кислота, 25% раствор.

3. Едкий натр, 10% раствор.

4. Сернокислая медь, 1% раствор.

Х о д р а б о т ы

1. Наливают в небольшую колбочку, снабженную обратным холодильником, 2—3 мл сыворотки и добавляют 15—20 мл раствора серной кислоты.

2. Соединяют колбочку с холодильником, пускают в него воду и нагревают содержимое колбочки, время от времени проделывая биуретовую реакцию с частью предварительно нейтрализованного гидролизата.

3. Продолжают кипячение содержимого колбы до получения отрицательной биуретовой реакции.

II. Кислотный гидролиз шелка и выделение тирозина

Шелк почти полностью состоит из белков. Свыше половины вещества шелка (около 53%) составляет белок фиброин. Последний содержит около 13% тирозина, т. е. очень богат этой аминокислотой. Шелк поэтому может служить хорошим объектом для получения из него тирозина.

Выделение тирозина производится путем гидролиза белка и осаждения свободного тирозина при нейтрализации и охлаждении гидролизата.

П р и б о р ы. 1. Круглодонная колба с обратным холодильником.

2. Химический стакан на 500 мл.

3. Коническая колба на 500 мл.

4. Воронка.

5. Водяная баня.

6. Микроскоп.

7. Штатив с пробирками.

¹ Обратным холодильником может служить длинная стеклянная трубка, вертикально вставленная в пробку колбочки.

- Реактивы.
1. Серная кислота, 25% раствор.
 2. Едкий натр, 10% раствор.
 3. Сернокислая медь, 1% раствор.
 4. Животный уголь, тщательно измельченный.
 5. Гашеная известь в виде кашицы.
 6. Уксусная кислота, 10% раствор.
 7. Реактив Миллона (приготовление см. стр. 331, п. 46).
 8. Шелк (обычно в виде отходов производства — шелковых очесов).

Ход работы

1. Помещают в круглодонную колбу 25 г шелка и 100 мл 25% серной кислоты.

2. Нагревают 1—2 часа содержимое колбы (до растворения шелка) на кипящей водяной бане, предварительно пустив ток воды в холодильник. Содержимое колбы необходимо время от времени перемешивать.

3. Переносят колбу на голый огонь (можно и с сеткой) и ведут гидролиз в продолжение 14—15 часов до получения отрицательной биуретовой реакции.

4. Гидролиз продолжают еще 1 час, затем нагревание прекращают и дают колбе остыть.

5. Переливают полученный гидролизат в химический стакан на 500 мл и обесцвечивают животным углем. Для этого к гидролизату добавляют 1—2 г мелко истолченного угля, встряхивают около 5 минут и фильтруют через складчатый фильтр в коническую колбу.

6. Переносят фильтрат опять в стакан и нейтрализуют добавлением гашеной извести до слабо щелочной реакции на лакмус. При этом, помимо нейтрализации, достигается удаление преобладающей части серной кислоты в виде плохо растворимого в воде сульфата кальция (CaSO_4).

7. Фильтруют содержимое стакана в коническую колбу, добавляя в случае необходимости немного горячей воды.

8. Промывают осадок на фильтре небольшим количеством горячей воды, соединяя промывные воды с фильтратом.

9. Полученную жидкость вновь переносят в стакан и точно нейтрализуют на лакмус раствором уксусной кислоты.

10. Выпаривают содержимое стакана на водяной бане до появления кристаллов на поверхности жидкости в виде пленки.

11. Охлаждают жидкость, кристаллы отфильтровывают, а фильтрат вновь упаривают, охлаждают и отфильтровывают. Полученные кристаллы тирозина имеют характерный шелковистый вид. Если они окрашены в желтоватый цвет, то их растворяют в горячей воде, кипятят с животным углем и полученный раствор фильтруют горячим. По охлаждении фильтрата выпадают более чистые кристаллы тирозина.

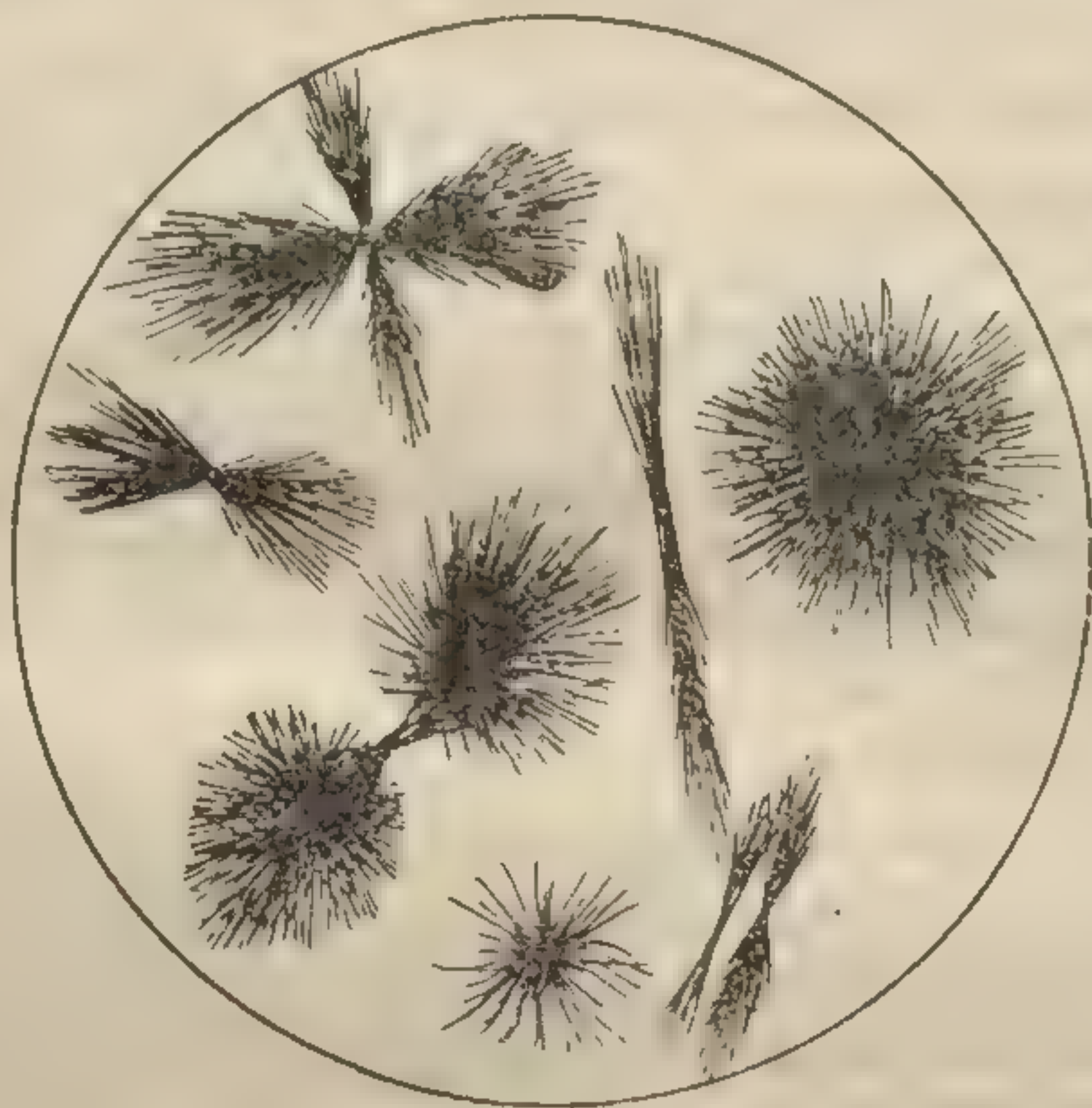


Рис. 2. Кристаллы тирозина.

12. Помещают 1—2 кристаллика полученного тирозина в пробирку, растворяют в воде и с раствором проводят реакцию Миллона. Наблюдают красное окрашивание.

13. Микроскопируют полученные кристаллы тирозина. Под микроскопом они имеют вид блестящих игл, собранных в снопики или розетки (рис. 2).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЗОТА АМИННЫХ ГРУПП МЕТОДОМ ФОРМОЛЬНОГО ТИТРОВАНИЯ

Определение свободных аминных групп белков, полипептидов и аминокислот весьма важно для изучения состава и строения белковой молекулы и продуктов ее гидролиза. По нарастанию аминоазота можно следить за ходом гидро-

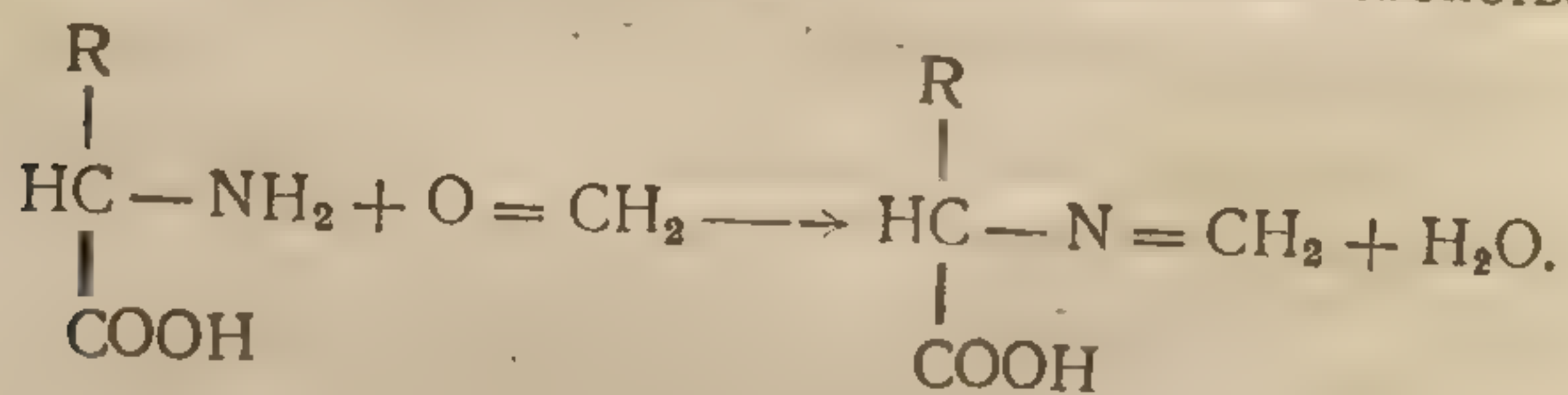
лиза белка и изучать действие протеолитических ферментов; если в начале гидролиза количество свободных аминных (и карбоксильных) групп невелико, то по мере расщепления белка они освобождаются за счет гидролиза пептидных связей. Конец гидролиза белка будет совпадать с моментом, когда количество аминных и карбоксильных групп в гидролизате перестанет увеличиваться. Определение аминокрупп необходимо также при изучении обмена белков и аминокислот в организме.

Методом формольного титрования Сёренсена оттитровывают свободные карбоксильные группы аминокислот, связывая аминные группы формальдегидом.

Аминокислоты содержат одновременно основную аминную и кислую карбоксильную группы. Они обладают амфотерными свойствами и в водных растворах обнаруживают нейтральную реакцию¹. На основании этого считают, что в аминокислотах аминная и карбоксильная группы нейтрализуют друг друга.

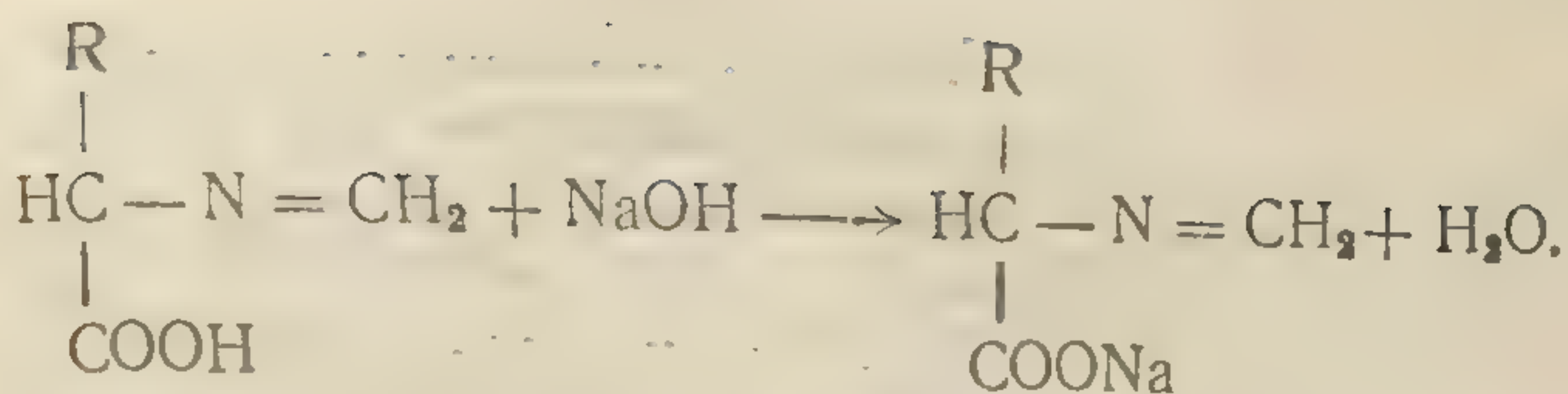
Таким образом, аминокислоты в водных растворах обладают характером внутримолекулярных солей; следовательно, непосредственно титровать карбоксильные группы аминокислот щелочью невозможно.

При взаимодействии аминокислот с формальдегидом аминокруппы реагируют с последним и образуются метиленовые производные аминокислот; при этом аминокруппы теряют свои основные свойства:



Карбоксильные же группы в метиленаминокислотах сохраняются без изменения и в этом случае могут быть оттитрованы щелочью:

¹ В случае преобладания в аминокислотах аминокрупп реакция будет слабо щелочная (например, лизин), а при преобладании карбоксильных групп — слабокислая (например, глютаминовая кислота).



Количество титруемых при этом карбоксильных групп эквивалентно количеству связанных формальдегидом аминных групп. Таким образом, результат титрования указывает на содержание аминных групп.

На этом свойстве аминокислот вступать во взаимодействие с формальдегидом и последующем титровании их щелочью и основано количественное определение свободных аминных групп по Сёренсену.

Точка эквивалентности при титровании метиленаминокислот по этому методу имеет место при $\text{pH} = 9,0 - 9,5$. Поэтому в качестве индикатора при титровании лучше всего пользоваться тимолфталеном, который изменяет свою окраску именно в этих пределах pH . Если же в качестве индикатора пользоваться фенолфталеном, как это обычно делают, то титровать нужно до яркочерного окрашивания ($\text{pH} = 9,1$). Так как бывает трудно сразу точно оттитровать щелочью, не прилив избытка, то избыток щелочи оттитровывают кислотой (обратное титрование) и снова добавляют щелочи до нужного оттенка. При расчете учитывают все количество прилитой щелочи за вычетом кислоты.

Метод формольного титрования довольно прост; однако следует помнить, что получаемые этим методом цифры не дают вполне точных данных о содержании азота аминокислот. Пролин дает с формальдегидом нестойкое соединение и несколько снижает результаты определения; тирозин, наоборот, вследствие присутствия фенольной группы дает повышенные результаты.

Для ознакомления с этим методом можно воспользоваться раствором глицина.

При достаточном количестве времени полезно определить аминокислотный азот на разных стадиях кислотного или ферментативного гидролиза белка.

- П р и б о р ы.
1. Конические колбочки, 2 шт.
 2. Пипетка на 20 мл.
 3. Пипетка на 10 мл.
 4. Бюретки, 2 шт.

- Р е а к т и в ы. 1. Глицин, приблизительно 0,1 н. раствор¹. Раствор должен быть нейтральным на лакмус.
2. Едкий натр или едкий барий, не содержащий карбоната, 0,2 н. раствор.
3. Соляная кислота, 0,2 н. раствор.
4. Формольная смесь (приготовление см. стр. 333, п. 62).

Х о д р а б о т ы ²

1. Наливают в небольшую колбочку 20 мл прокипяченной и охлажденной дистиллированной воды и 10 мл формольной смеси (содержащей одновременно и индикатор). Эта колбочка служит контролем для сравнения с опытным раствором.

2. В другую такую же колбочку отмеривают 20 мл исследуемого раствора с содержанием аминокрупп около 0,1 н. Добавляют в нее 10 мл формольной смеси.

3. Оттитровывают содержимое последней колбочки (опытный раствор) 0,2 н. щелочью до яркокрасной окраски.

4. Добавляют в колбочку с контрольным раствором приблизительно половину количества 0,2 н. щелочи, пошедшего на титрование опытного раствора.

5. Прибавляют к контрольному раствору 0,2 н. соляной кислоты до слабозеленого окрашивания ($pH = 8,3$), затем прибавляют каплю 0,2 н. щелочи до появления красного окрашивания ($pH = 8,8$); наконец, добавляют к контрольному раствору еще 2 капли щелочи до яркокрасного окрашивания ($pH = 9,1$). Затем в опытный раствор прибавляют 0,2 н. соляной кислоты до слабозеленой окраски и 0,2 н. щелочи до яркокрасного окрашивания, одинакового с контролем³.

¹ Можно заменить гидролизатом белка или растворами других аминокислот с приблизительно такой же концентрацией аминокрупп.

² Точные данные в этой работе, как и во многих других, могут быть получены только при совпадении результатов нескольких параллельных определений. Поэтому определение проводят обычно в 2—3 параллельных пробах и вычисляют среднюю величину.

³ Наличие контрольной пробы позволяет получить более точные результаты титрования. Добавление в нее избытка щелочи и

6. Производят вычисление содержания азота аминок групп. Для этого из общего количества миллилитров щелочи, пошедшего на титрование опытного раствора (за вычетом объема прибавленной соляной кислоты), вычитают количество миллилитров щелочи, пошедшее на титрование контрольного раствора (также за вычетом объема прибавленной соляной кислоты). Так как 1 мл 0,2 н. щелочи соответствует 2,8 мг азота¹, то, умножая полученное число миллилитров щелочи на 2,8, находят количество аминного азота в миллиграммах в исследуемом растворе. Поясним изложенное конкретным примером.

О п ы т н ы й р а с т в о р:

Прибавлено: $\begin{array}{r} 9,25 \text{ мл } 0,2 \text{ н. едкого натра} \\ - 0,20 \text{ мл } 0,2 \text{ н. соляной кислоты} \\ \hline 9,05 \text{ мл } 0,2 \text{ н. едкого натра.} \end{array}$

К о н т р о л ь н ы й р а с т в о р:

Прибавлено: $\begin{array}{r} 5,17 \text{ мл } 0,2 \text{ н. едкого натра} \\ - 4,91 \text{ мл } 0,2 \text{ н. соляной кислоты} \\ \hline 0,26 \text{ мл } 0,2 \text{ н. едкого натра.} \end{array}$

На опытную пробу пошло 9,05 мл 0,2 н. едкого натра.
На контроль пошло 0,26 мл 0,2 н. едкого натра.

Истрачено: $9,05 \text{ мл} - 0,26 \text{ мл} = 8,79 \text{ мл } 0,2 \text{ н. едкого натра.}$

Таким образом, в 20 мл исследуемого раствора содержится: $8,79 \times 2,8 = 24,61 \text{ мг аминного азота.}$

обратное титрование кислотой применяются для того, чтобы объемы опытной и контрольной проб были приблизительно одинаковы. Прибавление небольшого количества соляной кислоты в опытную пробу и вторичное титрование щелочью дают возможность точнее оттитровать опытную пробу до одинаковой окраски (одинакового pH) с контрольной пробой.

¹ Атомный вес азота равен 14. Нормальному раствору щелочи соответствует 14 г азота в 1 л или 14 мг в 1 мл (1 аминокгруппа на 1 эквивалент щелочи). Отсюда 1 мл 0,2 н. раствора соответствует 2,8 мг азота.

НУКЛЕОПРОТЕИДЫ

Нуклеопротеиды представляют собой очень важный класс сложных белков. Эти соединения являются необходимой составной частью каждого живого организма, ткани или клетки. Согласно исследованиям О. Б. Лепешинской, неклеточное живое вещество, способное образовывать клетки, содержит нуклеопротеиды.

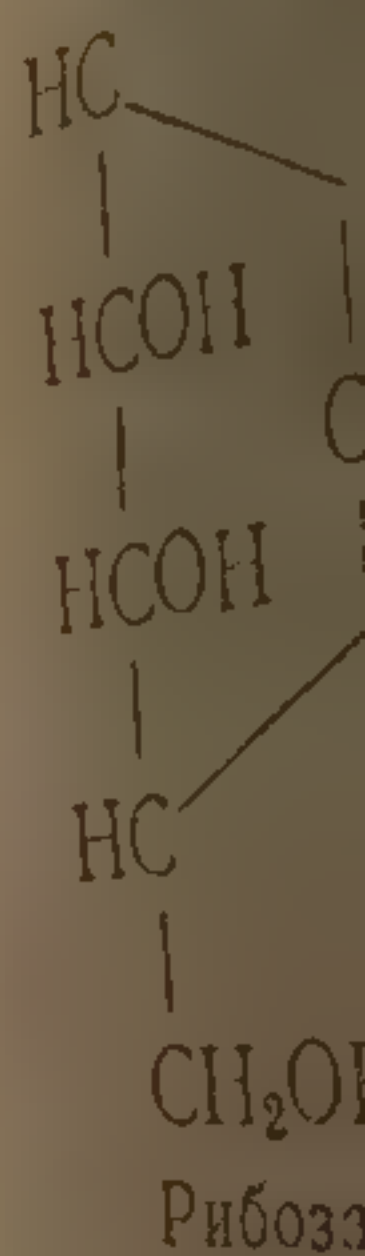
Биологическая роль нуклеопротеидов тесно связана с процессами роста и морфогенеза. Особенно важной функцией нуклеопротеидов является, повидимому, синтез белка. Быстро растущие органы и ткани (эмбриональные ткани, опухоли), а также органы, в которых интенсивно происходят синтетические процессы (кроветворные органы, поджелудочная железа, половые и другие железы), содержат особенно много нуклеопротеидов. Очень богаты нуклеопротеидами бактерии и другие микроорганизмы, а вирусы почти полностью построены из этих соединений.

Нуклеопротеиды состоят из простых белков и сложных высокомолекулярных соединений — нуклеиновых кислот. Различают два типа нуклеиновых кислот: рибонуклеиновую и дезоксирибонуклеиновую.

Прежде считали, что нуклеопротеиды (от латинского *nucleus* — ядро) содержатся только в клеточных ядрах, причем рибонуклеиновая (дрожжевая нуклеиновая) кислота характерна для растений, а дезоксирибонуклеиновая (тимонуклеиновая) кислота — для животных. Теперь показано, что дезоксирибонуклеиновая кислота является составной частью клеточных ядер как животных, так и растений, в то время как рибонуклеиновая кислота содержится в основном в цитоплазме клеток (особенно богаты ею митохондрии и микросомы).

Химически нуклеиновые кислоты представляют собой полинуклеотиды, т. е. полимеры многих мононуклеотидов, из которых каждый состоит из остатков пуринового или пиримидинового осно-

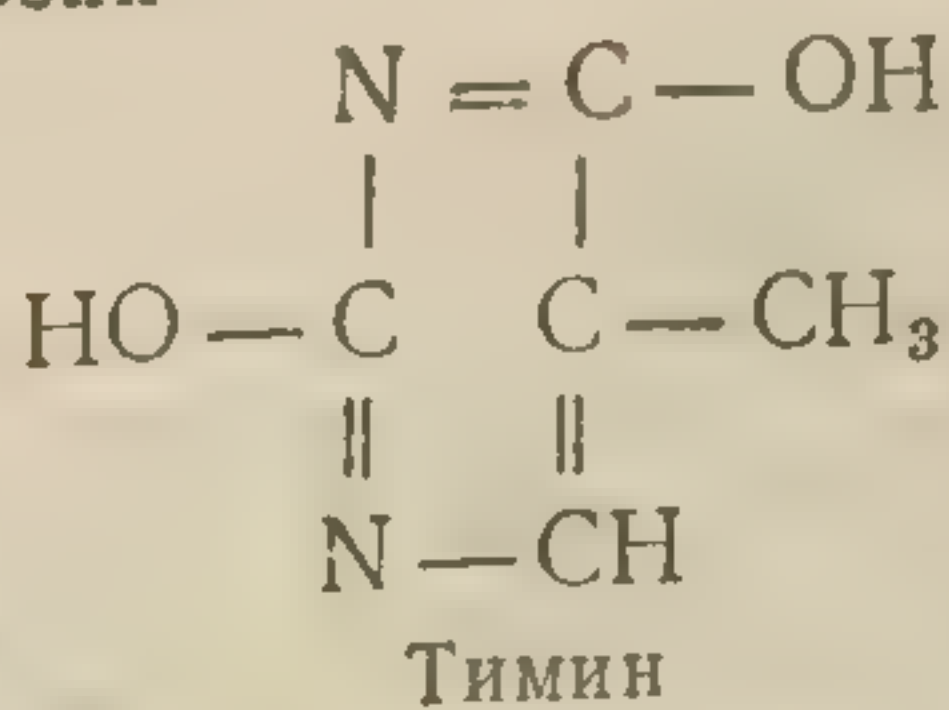
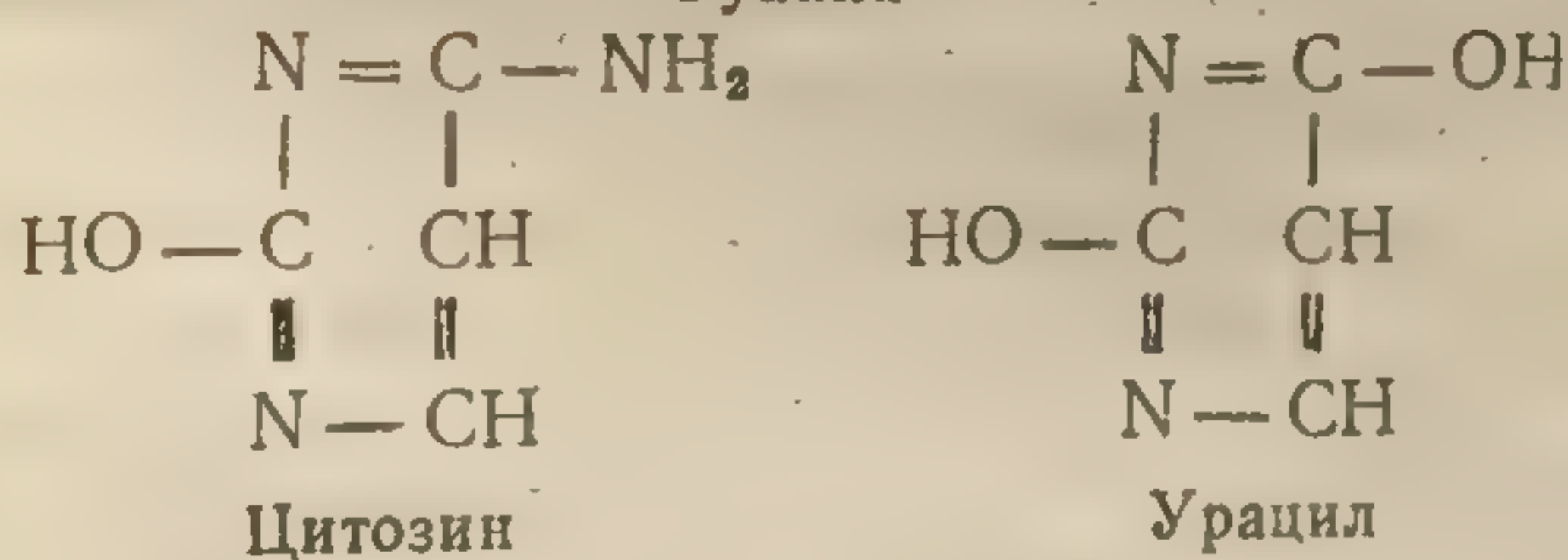
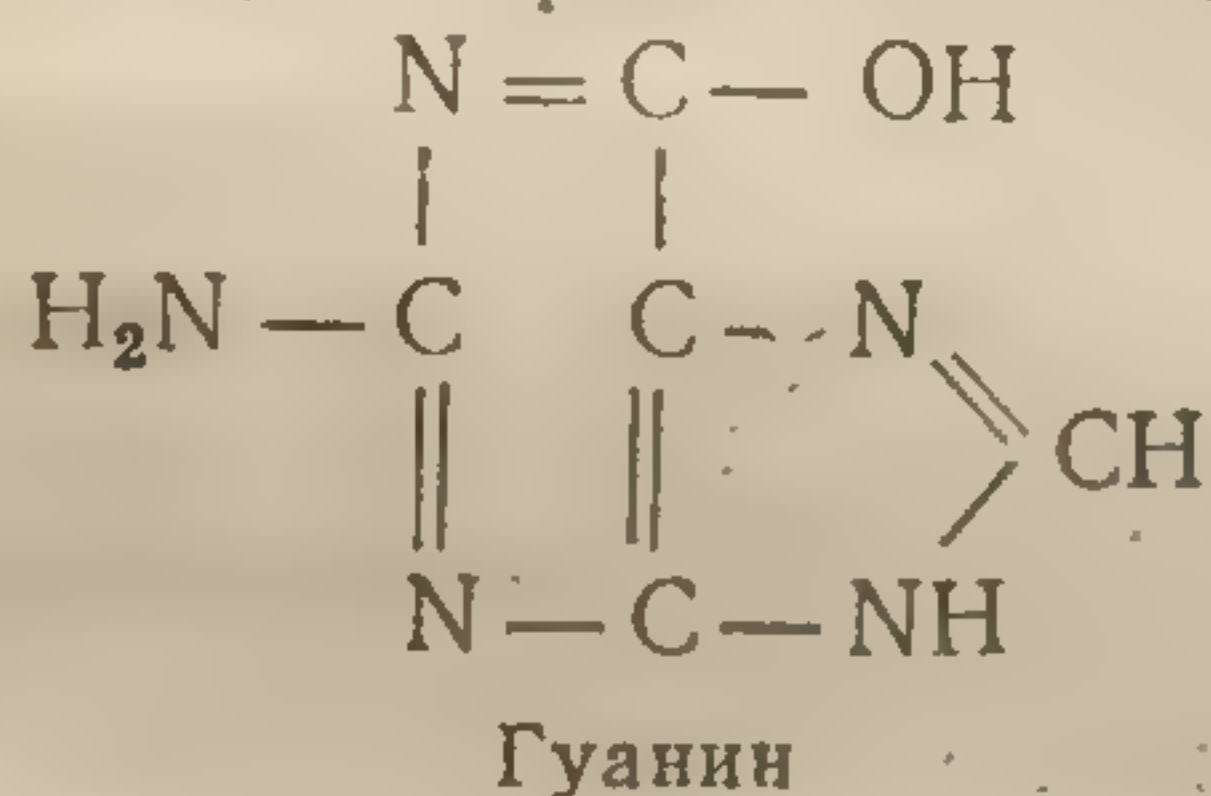
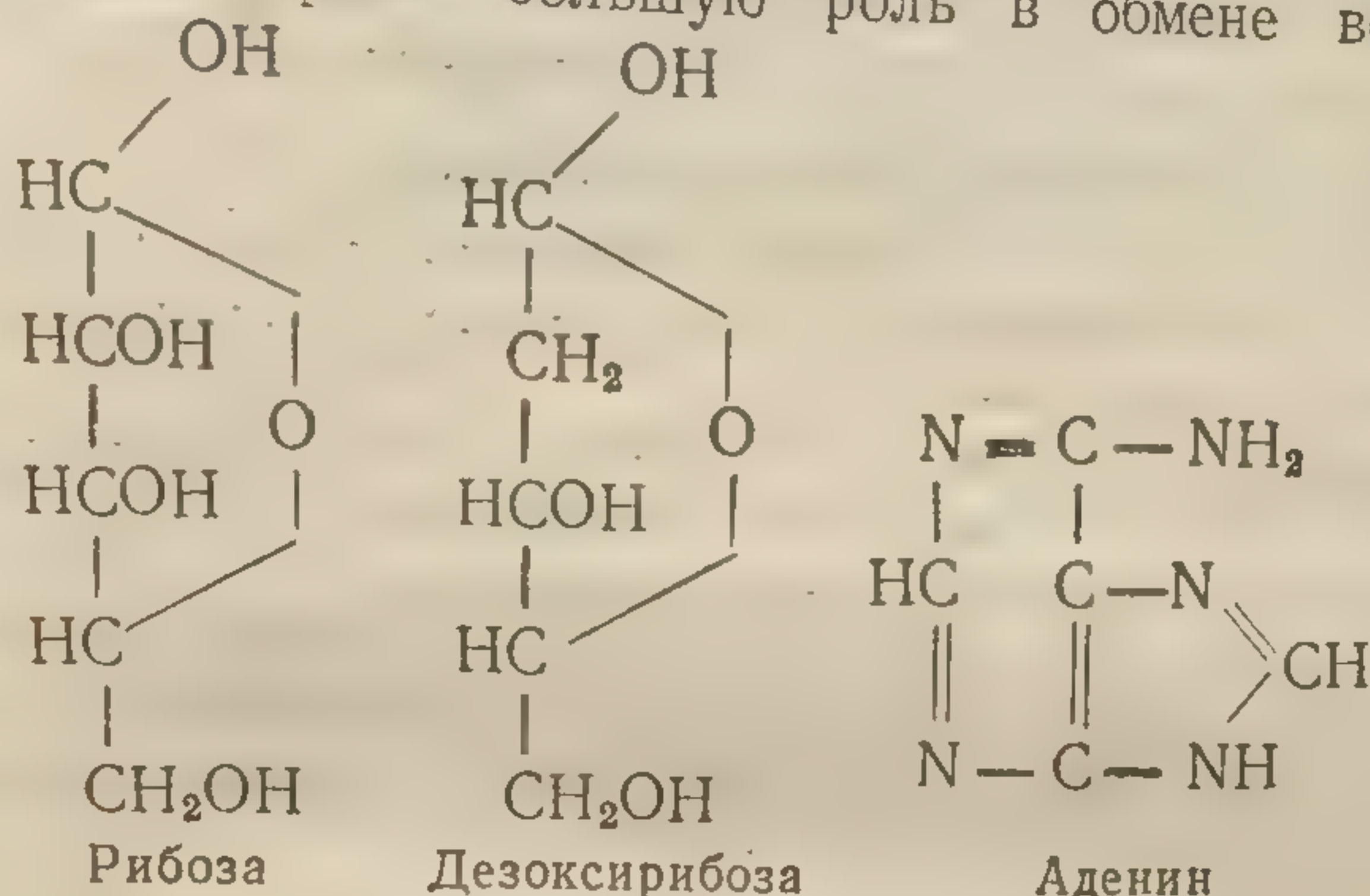
всех, состоят
рибонуклеиновой
за, в концент
аденин, гуани
рибонуклеино
рибозой, а
нуклеотиды и
ОН



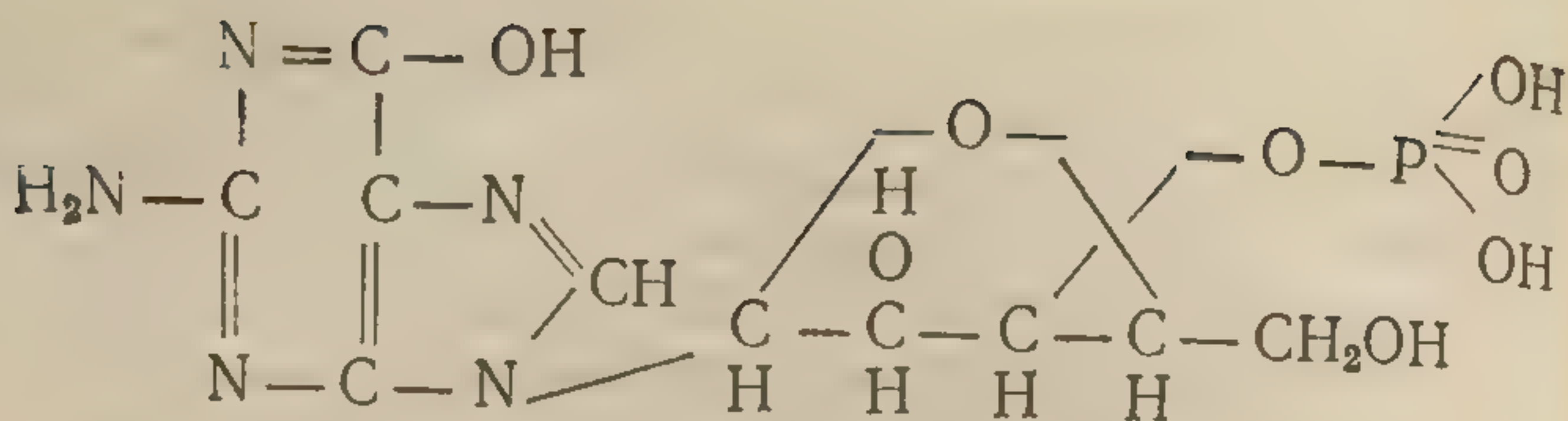
НО

В посл
лоты обнару

вания, простого сахара и фосфорной кислоты. В состав рибонуклеиновой кислоты в качестве сахара входит рибоза, а в качестве пуриновых и пиримидиновых оснований — аденин, гуанин, цитозин и урацил. В дезоксирибонуклеиновой кислоте рибоза заменена дезоксирибозой, а урацил — тимином¹. Многие простые нуклеотиды играют большую роль в обмене веществ.



¹ В последнее время в составе дезоксирибонуклеиновой кислоты обнаружен в небольших количествах также 5-метилцитозин.



Гуаниловая кислота (моноклеотид)

Нуклеопротеиды растворимы в щелочной среде и осаждаются кислотами: ядерные нуклеопротеиды осаждаются при малых концентрациях солей, но растворимы в крепких солевых растворах.

Если нуклеопротеиды кипятить с разведенными кислотами, то они подвергаются гидролитическому распаду — отщепляется и частично гидролизуется белок¹; нуклеиновые кислоты деполимеризуются, отщепляют пуриновые основания, моносахарид и фосфорную кислоту. Пиримидиновые основания отщепляются только при глубоком гидролизе нуклеиновых кислот.

• ПОЛУЧЕНИЕ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОПРОТЕИДА

Дезоксирибонуклеопротеиды являются главной составной частью клеточных ядер и могут быть названы также ядерными нуклеопротеидами. Получить дезоксирибонуклеопротеид легче всего из тканей, богатых клеточными ядрами (лейкоциты, сперматозоиды, вилочковая железа, селезенка). Характерным свойством ядерных нуклеопротеидов является их способность образовывать очень вязкие растворы в крепких растворах солей (например, в молярном растворе хлористого натрия) и нерастворимость в разведенных солевых растворах.

При осаждении из солевых растворов ядерные нуклеопротеиды выпадают в виде нитей. «Фосфористые белки», описанные еще в прошлом веке А. Я. Данилевским, являются в основном дезоксирибонуклеопротеидами. Ядерные нуклеопротеиды составляют также главную часть так называемых «структурных белков» различных тканей.

¹ Прежде считали, что в состав нуклеопротеидов входят только щелочные белки — гистоны и протамины. Исследованиями А. Н. Белозерского показано, что нуклеопротеиды содержат белки обычного типа (с изоэлектрической точкой в кислой среде).

- Приборы. 1. Ступка с пестиком.
2. Центрифуга с большими пробирками.
3. Весы для уравнивания центрифужных пробирок с гильзами.
4. стакан на 300—400 мл.
5. Цилиндр на 100 мл.
6. Деревянная палочка с насечками.
- Реактивы. 1. Селезенка¹ (кролика или быка).
2. Песок промытый и прокаленный.
3. Хлористый натрий, 1 м. раствор.

Ход работы

1. 2—3 г селезенки тщательно растирают в ступке с щепоткой песка.

2. Небольшими порциями добавляют в ступку 70—80 мл 1 м. раствора хлористого натрия, тщательно растирая содержимое в течение 15—20 минут.

3. Полученный очень вязкий раствор переносят в центрифужные пробирки, уравнивают их и центрифугируют в течение 10—15 минут. Измеряют объем полученного центрифугата.

4. Отмеривают шестикратный (по отношению к центрифугату) объем воды, наливают его в стакан и, медленно вращая в нем деревянную палочку, вливают в воду центрифугат.

5. Наматывают на палочку образующиеся нити ядерного нуклеопротеида. Осторожно переносят их в другую пробирку и используют для реакции на дезоксирибонуклеиновую кислоту.

* РЕАКЦИЯ НА ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВУЮ КИСЛОТУ

Дезоксирибонуклеиновая кислота дает ряд цветных реакций, по которым ее можно отличить от рибонуклеиновой кислоты. Эти реакции обусловлены наличием в молекуле ядерной нуклеиновой кислоты дезоксирибозы. Для обнаружения дезоксирибонуклеиновой кислоты наиболее употребительна реакция с дифениламином $C_6H_5-NH-C_6H_5$. Дифениламинный реактив дает с дезоксирибозой и

¹ Лучше брать вилочковую железу (тимус).

дезоксирибонуклеиновой кислотой с и н е е окрашивание. Рибоза и рибонуклеиновая кислота дают зеленую окраску.

П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.
2. Водяная баня.

Р е а к т и в ы. 1. Дифениламиновый реактив, (приготовление см. стр. 324, п. 15).
2. Едкий натр, 0,4% раствор.

Х о д р а б о т ы

1. Небольшое количество осадка дезоксирибонуклеопротеида переносят в пробирку и растворяют его в 0,5—1 мл раствора едкого натра.

2. Добавляют равный объем дифениламинового реактива (до растворения образующегося осадка) и ставят в кипящую водяную баню на 15—20 минут. Наблюдается синее окрашивание.

ПОЛУЧЕНИЕ НУКЛЕОПРОТЕИДА ИЗ ДРОЖЖЕЙ

Дрожжи богаты нуклеопротеидами (главным образом рибозного типа). Нуклеопротенд можно извлечь из разрушенных дрожжевых клеток при щелочной реакции раствора и осадить при его подкислении.

П р и б о р ы. 1. Ступка с пестиком.
2. Стаканчик или колбочка на 50—100 мл.
3. Цилиндр на 100 мл.
4. Центрифуга с большими пробирками¹.
5. Весы для уравнивания центрифужных пробирок с гильзами.
6. Пипетка.
7. Стеклянная палочка.

Р е а к т и в ы. 1. Прессованные дрожжи.
2. Диэтиловый эфир.
3. Песок промытый и прокаленный.
4. Едкий натр, 0,4% раствор.
5. Уксусная кислота, 5% раствор.

¹ Центрифугирование можно заменить фильтрованием.

Ход работы

1. 5—10 г дрожжей помещают в ступку и смачивают их 10—15 каплями эфира (для разрушения дрожжевых клеток) и таким же количеством воды. Добавляют щепотку песка и тщательно растирают содержимое ступки.

2. Приливают в ступку 30—50 мл раствора едкого натра и продолжают растирание в течение 15—20 минут.

3. Переливают содержимое ступки в центрифужные пробирки, уравнивают их и центрифугируют¹.

4. Центрифугат сливают в стаканчик и, непрерывно помешивая палочкой, приливают из пипетки раствор уксусной кислоты (12—15 мл) до полного осаждения нуклеопротеида.

5. Осадок нуклеопротеида собирают при помощи центрифугирования¹ и используют для гидролиза (см. следующее занятие).

ГИДРОЛИЗ НУКЛЕОПРОТЕИДА

Частичный гидролиз нуклеопротеидов можно осуществить путем кипячения с 5% серной кислотой в течение часа. При этом прежде всего происходит расщепление на белок и нуклеиновую кислоту. Нуклеиновая кислота далее распадается на отдельные нуклеотиды и отщепляет в первую очередь пуриновые основания (аденин и гуанин) и фосфорную кислоту. Белок также подвергается за это время частичному гидролизу.

Продукты расщепления нуклеопротеидов, а также и пентозу, которая частично отщепляется в свободном виде, можно обнаружить при помощи специальных реакций.

Пуриновые основания открывают по образованию осадка серебряных солей, фосфорную кислоту — по реакции с молибденово-кислым аммонием, а пентозу — по характерным реакциям с орцином и флороглюцином.

П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.

2. Колбочка с пробкой, снабженной длинной стеклянной трубкой, служащей обратным холодильником.

3. Воронка с фильтром.

Р е а к т и в ы. 1. Серная кислота, 5% раствор.

2. Едкий натр, 10% раствор.

3. Медь сернокислая, 1% раствор.

¹ См. сноску на стр. 46.

4. Реактив Миллона (приготовление см. стр. 331, п. 46).
5. Орциновый реактив (приготовление см. стр. 327, п. 29).
6. Флороглюцин, 0,2% раствор в 30% соляной кислоте.
7. Аммиак, концентрир. раствор.
8. Аммиачный раствор серебра (приготовление см. стр. 322, п. 4).
9. Раствор молибденовокислого аммония в азотной кислоте (приготовление см. стр. 325, п. 20).
10. Магнезиальная смесь (приготовление см. стр. 325, п. 19).

Ход работы

1. Нуклеопротеид, полученный из дрожжей, переносят в колбочку для гидролиза и добавляют туда 15—20 мл раствора серной кислоты.

2. Закрывают колбочку пробкой с обратным холодильником и осторожно кипятят содержимое в течение часа.

3. Гидролизат после охлаждения отфильтровывают.

4. Проделывают с гидролизатом реакции на белок: биуретовую и миллонову (см. стр. 9 и 14).

5. Далее производят реакции на пентозу с орцином и с флороглюцином (см. стр. 135)¹.

6. Производят пробу на пуриновые основания. Для этого к 1—2 мл гидролизата приливают 5—6 капель раствора аммиака до щелочной реакции на лакмус и добавляют около 0,5 мл аммиачного раствора серебра. Образуется хлопьевидный осадок серебряных солей пуриновых оснований, который постепенно осаждается на дно.

7. Открывают фосфорную кислоту. К 1—2 мл гидролизата добавляют равный объем раствора молибденовокислого аммония в азотной кислоте и нагревают. Образуется желтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

В другой пробирке около 1 мл гидролизата нейтрализуют концентрированным раствором аммиака и добавляют около 1 мл магнезиальной смеси. Выпадает белый кристаллический осадок фосфорнокислого магний-аммония.

¹ Присутствие моносахарида можно открыть также реакцией Троммера (см. стр. 131).

ферменты, собирающие большинство веществ, тканевые жидкости и др.

Можно сказать, что ферментная активность зависит от многих факторов. Изучение проблемы биохимической промышленности и т. п.)¹.

Ферменты — это биологические катализаторы, ускоряющие химические реакции в живых организмах (например, в клетках и тканях). Ряд ферментов участвует в процессе пищеварения и др.).

Являясь биологическими катализаторами, ферменты ускоряют химические реакции в живых организмах.

Многие ферменты являются белками, состоящими из аминокислот. Они могут быть активными или неактивными. Активные ферменты участвуют в различных биохимических процессах, таких как пищеварение, дыхание, синтез белков и др.

¹ Вопросы биохимии. А. И. Опарин. 4. Практикум по биохимии.

ФЕРМЕНТЫ

Ферменты, или энзимы, — биологические катализаторы, образующиеся в живых клетках. Подавляющее большинство химических превращений (например, пищеварение, тканевое дыхание), происходящих в тканях и жидкостях организма, протекает под действием ферментов.

Можно сказать, что жизнедеятельность в той или иной мере зависит от содержания и активности ферментов в организме. Изучение ферментов поэтому является важнейшей проблемой биохимии.

Многие ферменты находят применение в ряде отраслей промышленности (хлебопечение, виноделие, сыроделие и т. п.)¹.

Ферменты представляют собой вещества белковой природы. Многие из них содержат и небелковый компонент, образуя сложный белок (дегидразы, оксидазы и др.). Ряд ферментов получен теперь в кристаллическом виде (пепсин, трипсин, уреаза, каталаза, амилаза и др.).

Являясь белками, ферменты проявляют свою высокую каталитическую активность в коллоидном состоянии.

Многие ферменты образуются тканями в недействительном состоянии и в виде предшественников ферментов (проферментов, или зимогенов) и переходят в собственно ферменты под действием специальных активаторов. Так, И. П. Павловым было показано, что пепсиноген переходит в активный пепсин под действием соляной кислоты желудочного сока, поджелудочная липаза активируется желчью, а неактивный трипсиноген переходит в активный трипсин под действием особого «фермента

¹ Вопросы технической биохимии [подробно разработаны А. И. Опариним и его сотрудниками.

ферментов» — э н т е р о к и н а з ы, открытой в лаборатории И. П. Павлова Н. П. Шеповальниковым.

Важнейшие свойства ферментов: потеря активности (ин-активация) при нагревании, ярко выраженная зависимость активности от концентрации водородных ионов, специфичность действия на субстрат.

Существенным и часто характерным для данного эн-зима является отношение его к с о п у т с т в у ю щ и м в е щ е с т в а м, усиливающим или замедляющим его дей-ствие.

Химических знаний о строении энзимов пока недостаточ-но для рациональной их систематики. Поэтому ферменты к л а с с и ф и ц и р у ю т по их действию.

Название фермента обычно производят от субстрата, на который он действует, или от химической реакции, которую он ускоряет, с добавлением окончания «аза». Так, например, протейназами называют ферменты, катали-зирующие распад белков; гидролазами называют все фер-менты, способствующие гидролизу любых сложных ве-ществ.

ГИДРОЛИЗ КРАХМАЛА

Простым и наглядным примером, демонстрирующим действие ферментов и некоторые их свойства, является гидролиз крахмала под действием амилазы слюны. По-этому, прежде чем перейти к изучению главнейших свойств ферментов на этом объекте, необходимо остановиться на гидролизе крахмала.

К р а х м а л ($C_6H_{10}O_5$)_n является одним из важнейших углеводов и содержится в значительных количествах в та-ких продуктах питания, как мучные изделия, крупы, кар-тофель и т. п.

В пищеварительном канале крахмал подвергается рас-паду до г л ю к о з ы, которая и всасывается в кровь из кишечника.

Под влиянием фермента слюны амилазы крахмал гид-ролизуется до дисахарида м а л ь т о з ы. Молекула крах-мала при гидролизе распадается постепенно, проходя через стадии д е к с т р и н о в.

Крахмал является в ы с о к о м о л е к у л я р н ы м п о л и с а х а р и д о м и практически не имеет свободных альдегидных групп, так как связь между остатками глю-козы в молекуле крахмала осуществляется через первый

и четвертый (и частично через шестой) атомы углерода глюкозы. Из-за отсутствия свободных альдегидных групп крахмал не дает ни реакции Троммера, ни реакции с фелинговой жидкостью (см. стр. 131 и 132)¹.

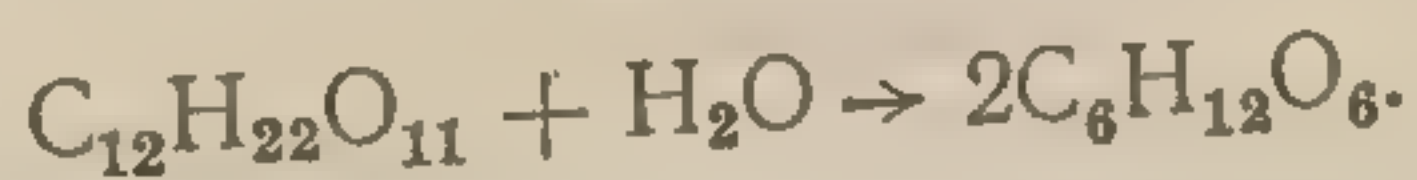
Продукты расщепления крахмала, близкие к мальтозе, мальтоза и глюкоза, как имеющие свободные альдегидные группы, дают положительную реакцию Троммера и реакцию с фелинговой жидкостью.

Крахмал, растворимый крахмал и более близкие к крахмалу декстрины дают с и н е е о к р а ш и в а н и е с и о д о м; декстрины, являющиеся продуктами дальнейшего расщепления крахмала, дают к р а с н о б у р о е окрашивание; продукты расщепления крахмала, близкие к мальтозе, и мальтоза не дают окрашивания.

Раствор крахмала о п а л е с ц и р у е т (представляется слегка мутноватым) вследствие своего коллоидного состояния; раствор же гидролизата крахмала такой опалесценции не имеет.

Для демонстрации гидролиза крахмала с помощью ферментов удобно воспользоваться слюной, которая содержит амилазу. Кроме амилазы, слюна содержит также небольшое количество мальтазы (расщепляет мальтозу до глюкозы).

Прибавляя к раствору крахмала немного слюны, можно перевести крахмал сначала в так называемый растворимый крахмал, затем в декстрины и, наконец, в мальтозу. Часть мальтозы под влиянием мальтазы превращается в глюкозу по уравнению:



Таким образом, наличие довольно глубокого гидролиза крахмала можно определить с помощью раствора иода и реакций Троммера и с фелинговой жидкостью.

Гидролиз крахмала можно провести также к и п я ч е н и е м с с е р н о й к и с л о т о й (н е о р г а н и ч е с к и й к а т а л и з а т о р), что в итоге также дает превращение крахмала в глюкозу.

¹ В действительности в молекулах полисахаридов крахмала содержится по одной альдегидной группе на сотни и даже тысячи глюкозных остатков, что, однако, не обнаруживается при названных реакциях.

Если теперь сравнить эти два способа гидролиза крахмала (с помощью ферментов и с помощью серной кислоты), то следует отметить их характерные особенности:

1. Ферментативные реакции лучше всего идут при относительно невысокой (около 40°) температуре, а высокая температура (как это будет изложено дальше) даже остановит реакцию. Реакции с помощью неорганического катализатора, наоборот, обычно ускоряются с повышением температуры.

2. Действие фермента гораздо более специфично. Амилаза расщепляет только крахмал и близкие к нему полисахариды (например, гликоген) до стадии мальтозы. Кислота (неорганический катализатор) вызывает гидролиз крахмала до глюкозы и катализирует также гидролиз других соединений (например, белков).

3. Ферменты очень чувствительны к концентрации водородных ионов и к ряду сопутствующих веществ. Пределы чувствительности неорганических катализаторов значительно шире.

П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.

2. Воронка с фильтром.

3. Стеклянные палочки.

4. Стеклянная пластинка.

5. Водяная баня.

6. Термометр.

7. Стаканчик.

Р е а к т и в ы. 1. Разбавленная слюна: ополаскивают рот дистиллированной водой и тем очищают его от остатков пищи; набирают новую порцию дистиллированной воды в рот и держат ее во рту в течение 1—2 минут, смешивая со слюной; жидкость выпускают в стаканчик и профильтровывают в пробирку.

2. Раствор иода в иодистом калии (приготовление см. стр. 329, п. 39).

3. Крахмал, 1% раствор в воде, содержащей 0,3% хлористого натрия¹, свежеприготовленный.

¹ Хлористый натрий в разбавленных растворах ускоряет действие амилазы на крахмал (является активатором).

4. Едкий натр, 10% раствор.
5. Серная кислота, 10% раствор.
6. Сернокислая медь, 5% раствор.
7. Фелингова жидкость (приготовление см. стр. 333, п. 59).

Ход работы

1. Ферментативный гидролиз крахмала

1. Наносят на стеклянную пластинку, под которую подложен лист белой бумаги, ряд капель (отдельных) раствора иода.

2. Наливают в пробирку около 5 мл раствора крахмала и около 3 мл дистиллированной воды (контрольный опыт). В другую пробирку наливают около 5 мл раствора крахмала и около 3 мл разбавленной слюны.

3. Встряхивают обе пробирки, ставят их в водяную баню при 37° и помещают в них по стеклянной палочке.

4. Время от времени берут стеклянными палочками из каждой пробирки капли жидкости и наносят их на капли раствора иода.

Сначала синее окрашивание будет появляться от капель, взятых из обеих пробирок; затем из пробирки, где есть амилаза, капля начнет давать с иодом красноватый оттенок. Скоро отмечают, что капли жидкости из пробирки со слюной окрашивания более не дают; капли же, взятые из контрольного опыта, все время дают синее окрашивание.

5. Наблюдают наличие опалесценции в контрольной пробирке (без слюны) и отсутствие опалесценции во второй пробирке (со слюной).

6. Отдельно проделывают с 1—2 мл содержимого каждой пробирки реакцию Троммера (см. стр. 131). С содержимым контрольной пробирки (без слюны) реакция будет отрицательная, с содержимым второй пробирки (со слюной) — положительная.

7. Отдельно проделывают с частью содержимого обеих пробирок реакцию с фелинговой жидкостью (см. стр. 132). Для этого к 1—2 мл исследуемой жидкости добавляют около 1 мл фелинговой жидкости и нагревают. С раствором крахмала реакция будет отрицательная, с раствором гидролизата крахмала (со слюной) — положительная, т. е. образуется красный осадок закиси еди.

II. Кислотный гидролиз крахмала

1. Наливают в небольшой стаканчик около 15 мл раствора крахмала (обратить внимание на опалесценцию раствора) и около 5 мл 10% серной кислоты.

2. Кипятят жидкость минут десять, добавляя по мере выкипания дистиллированную воду.

3. Охлаждают содержимое стаканчика (обратить внимание на отсутствие опалесценции раствора) и нейтрализуют раствором щелочи.

4. Отдельно проделывают с частью нейтрализованного гидролизата реакцию Троммера (см. стр. 131) и реакцию с фелинговой жидкостью (см. стр. 132). Обе реакции будут положительными.

ТЕРМОЛАБИЛЬНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

При низкой температуре ферментативные реакции идут медленно. По мере повышения температуры скорость ферментативных реакций обычно повышается. По достижении некоторого оптимума повышение температуры уже ведет к падению активности фермента и вследствие этого к понижению скорости ферментативных реакций. Так, уже при температуре раствора в $50-60^{\circ}$ часто происходит температурная инактивация ферментов. Для огромного большинства ферментов температурный оптимум лежит в пределах $37-50^{\circ}$.

В зависимости от состояния, в котором находится фермент, температурная устойчивость его не одинакова. Так, сухие препараты некоторых ферментов выдерживают нагревание даже до 100° без заметной потери своей активности. В растворе же эти ферменты при 100° целиком теряют свою каталитическую активность.

Низкие температуры не инактивируют ферментов. Как правило, они лишь замедляют или останавливают их действие.

Влияние температуры на активность ферментов легко можно проследить на примерах действия на крахмал ферментов слюны и действия на молоко сычужного фермента¹.

¹ Препарат сычужного фермента получается путем экстракции высушенных желудков молодых телят. В желудке взрослых животных, а также человека сычужный фермент (химозин) отсутствует и свертывание молока осуществляется пепсином (см. стр. 310).

- Приборы.**
1. Штатив с пробирками.
 2. Водяная баня.
 3. Термометр.
 4. Стакан со льдом или снегом.

- Реактивы.**
1. Раствор иода в иодистом калии (приготовление см. стр. 329, п. 39).
 2. Крахмал, 1% раствор в воде, содержащей 0,3% хлористого натрия, свежеприготовленный.
 3. Едкий натр, 10% раствор.
 4. Сернокислая медь, 5% раствор.
 5. Фелингова жидкость (приготовление см. стр. 333, п. 59).
 6. Разбавленная слюна.
 7. Сычужный фермент, 0,1% раствор в 0,9% растворе хлористого натрия.
 8. Молоко, сырое, охлажденное.

Ход работы

I. Влияние температуры на активность амилазы слюны

1. Наливают в 2 пробирки приблизительно по 5 мл раствора крахмала. В одну из них добавляют около 1 мл разбавленной слюны, которая должна быть предварительно тщательно прокипячена. В другую пробирку добавляют около 1 мл некипяченой разбавленной слюны.

2. Перемешивают содержимое и ставят обе пробирки в водяную баню при 37° на 10 минут.

3. Убеждаются с помощью раствора иода и реакции Троммера (или реакции с фелинговой жидкостью) в том, что гидролиз крахмала в пробирке с прокипяченной слюной не произошел, так как фермент в ней разрушился, но имел место в пробирке с непрокипяченной слюной.

II. Влияние температуры на активность сычужного фермента

1. В три пробирки наливают по 1—2 мл раствора сычужного фермента.

2. Тщательно кипятят содержимое одной пробирки (№ 1). Затем все три пробирки ставят в холодную воду.

3. Приливают в каждую пробирку по 2—3 мл молока, перемешивают и быстро ставят одну пробирку (№ 2) в ледяную воду, а две другие (в том числе с прокипяченным ферментом) в водяную баню при 38—40°.

4. Через некоторое время (в зависимости от активности фермента, обычно через 8—10 минут) молоко свертывается в пробирке с непрокипяченным ферментом (№ 3) и не свертывается в пробирке с прокипяченным ферментом (№ 1).

Следует убедиться в том, что в пробирке № 2, помещенной в ледяную воду, имело место не разрушение фермента, а лишь замедление его действия под влиянием низкой температуры. Для этого пробирку вынимают из ледяной воды и наблюдают отсутствие свертывания молока. Затем ставят ее в водяную баню при 38—40° и наблюдают свертывание молока.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Ферменты обладают специфичностью действия, т. е. каждый фермент действует только на одно вещество или на группу сходных веществ. Так, например, амилаза гидролизует крахмал, а липаза—жиры. Несмотря на то, что и в том, и в другом случае мы имеем дело с процессами гидролиза, липаза не может заменить амилазу, и наоборот.

В указанных выше случаях специфичность ограничивается определенной группой веществ. Однако имеется еще более высокая степень специфичности, когда фермент, расщепляя только один оптический изомер, оставляет без изменения другой.

Специфичность действия фермента на данный субстрат зависит от наличия определенных химических групп и конфигурации субстрата.

В качестве объектов исследования специфичности ферментов удобно взять ферменты слюны (амилазу и мальтазу) и сахаразу, а в качестве субстратов — соответственно крахмал и сахарозу.

Под действием ферментов слюны, как мы видели, крахмал легко гидролизует до мальтозы и частично до глюкозы, которые, имея свободные альдегидные группы, дают положительные реакции Троммера и с фелинговым реактивом.

Молекула сахарозы состоит из остатков молекул глюкозы и фруктозы.

Сахароз
групп и
(см. стр. 12)
после дейст
под влияни
козу и фрук
Иная к
ны взять
крахмал у
на него са
вой жидк
под влиян
тозу и по
ции восст
ных карбо
Приб

Реак



Сахароза не имеет свободных альдегидных или кетонных групп и не дает реакций восстановления металлов (см. стр. 128). Эти реакции оказываются отрицательными и после действия на сахарозу ферментов слюны, т. е. сахароза под влиянием амилазы и мальтазы не распадается на глюкозу и фруктозу.

Иная картина наблюдается, если вместо ферментов слюны взять фермент сахаразу (инвертазу). В этих условиях крахмал уже гидролизоваться не будет, и после действия на него сахаразы реакция Троммера и реакция с фелинговой жидкостью останутся отрицательными. Сахароза же под влиянием инвертазы распадается на глюкозу и фруктозу и полученный гидролизат даст положительные реакции восстановления металлов за счет появления свободных карбонильных групп.

Приборы. 1. Штатив с пробирками.

2. Водяная баня.

3. Термометр.

Реактивы. 1. Сахароза, 2% раствор.

2. Крахмал, 1% раствор в воде, содержащей 0,3% хлористого натрия, свежеприготовленный.

3. Разбавленная слюна.

4. Раствор сахаразы (приготовление см. стр. 330, п. 42).

5. Едкий натр, 10% раствор.
6. Сернокислая медь, 5% раствор.
7. Фелингова жидкость (приготовление см. стр. 333, п. 59).

I. Специфичность амилазы

1. Испытывают раствор сахарозы с помощью реакции Троммера или реакции с фелинговой жидкостью. Реакции, если препарат сахарозы чист, будут отрицательными.
2. Наливают в одну пробирку 4—5 мл раствора крахмала, а в другую 4—5 мл раствора сахарозы.
3. Добавляют в обе пробирки приблизительно по 1 мл разбавленной слюны и, перемешав содержимое каждой пробирки, ставят их в водяную баню при 37°.
4. Исследуют минут через десять содержимое обеих пробирок с помощью реакции Троммера или реакции с фелинговой жидкостью и убеждаются в гидролизе крахмала и в отсутствии гидролиза сахарозы.

II. Специфичность сахаразы

1. В одну пробирку наливают 4—5 мл раствора крахмала, в другую 4—5 мл раствора сахарозы.
2. Добавляют в обе пробирки приблизительно по 1 мл раствора сахаразы и, перемешав содержимое каждой пробирки, ставят их минут на десять в водяную баню при 37°.
3. В обеих пробирках проводят реакции Троммера или с фелинговой жидкостью и убеждаются в отсутствии гидролиза крахмала и в гидролизе сахарозы.

ВЛИЯНИЕ pH НА ДЕЙСТВИЕ ФЕРМЕНТОВ

Ферменты очень чувствительны к изменению кислотности среды, в которой они действуют. Так, пепсин гидролизует белки только в кислой среде. Трипсин, наоборот, катализирует гидролиз только в слабо щелочной среде.

Можно считать, что для каждого фермента имеется определенная оптимальная концентрация водородных ионов, при которой он наиболее активен. Изменение активной кислотности среды в ту или другую сторону от оптимума pH вызывает понижение активности фермента.

Влияние рН на действие ферментов можно проиллюстрировать на примере действия амилазы слюны на крахмал. Активность амилазы слюны выше всего при почти нейтральной реакции ($pH = 6,8$) и подавляется как кислотами, так и щелочами.

I. Влияние реакции среды на действие ферментов

П р и б о р ы.

1. Пипетка на 10 мл с делениями.
2. Две пипетки на 1 мл.
3. Штатив с пробирками.
4. Бюретка.
5. Водяная баня.
6. Термометр.

Р е а к т и в ы.

1. Соляная кислота, 0,2% раствор.
2. Сода углекислая, 1% раствор.
3. Крахмал, 1% раствор, свежеприготовленный.
4. Слюна, разведенная в десять раз дистиллированной водой.
5. Раствор иода в иодистом калии (приготовление см. стр. 329, п. 39).

Х о д р а б о т ы

1. Наливают пипеткой в 8 пронумерованных пробирок по 1 мл дистиллированной воды.

2. В первую пробирку отмеривают 1 мл раствора соляной кислоты.

3. Перемешивают жидкость первой пробирки при помощи троскратного втягивания пипеткой и последующего выпуска содержимого пробирки из пипетки, а затем переносят 1 мл полученной смеси из первой пробирки во вторую.

4. Перемешивают таким же образом содержимое второй пробирки и переносят 1 мл полученной смеси из второй пробирки в третью и т. д. Из восьмой пробирки 1 мл смеси как излишний выливают и, таким образом, получают различное разведение соляной кислоты во всех 8 пробирках.

5. Наливают во все пробирки из бюретки по 2 мл раствора крахмала и из пипетки по 1 мл разведенной в 10 раз свежей слюны.

6. Перемешивают встряхиванием содержимое пробирок и ставят их в водяную баню при 37°.

7. Вынимают через 15 минут пробирки из бани, охлаждают их в холодной воде, добавляют в каждую пробирку по 2—3 капли раствора иода и перемешивают содержимое.

8. Определяют, при какой концентрации кислоты происходит расщепление крахмала.

Аналогичный опыт проделывают с раствором соды, беря ее вместо соляной кислоты.

II. Определение оптимума pH действия амилазы

П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.
2. Микробюретки, 2 шт.
3. Пипетка на 10 мл с делениями.

Р е а к т и в ы. 1. Крахмал, 0,5% раствор в воде, содержащей 0,3% хлористого натрия, свежеприготовленный.
2. Свежая слюна, разведенная дистиллированной водой в 250 раз.
3. Раствор иода в иодистом калии (приготовление см. стр. 329, п. 39).
4. Фосфорнокислый натрий, двузамещенный, 0,2 м. раствор.
5. Лимонная кислота, 0,1 м. раствор.

Х о д р а б о т ы

1. Приготавливают по 2,5 мл буферных растворов различных pH, от 5 до 8. Для этого в 8 пробирок наливают из микробюреток следующие количества 0,2 м. раствора фосфата натрия и 0,1 м. раствора лимонной кислоты.

№ пробирки	0,2 м. раствор Na ₂ HPO ₄ в мл	0,1 м. раствор лимонной кислоты в мл	pH
1	1,29	1,21	5,0
2	1,51	0,99	5,8
3	1,65	0,85	6,2
4	1,82	0,68	6,6
5	1,93	0,57	6,8
6	2,06	0,44	7,0
7	2,27	0,23	7,4
8	2,43	0,07	8,0

2. В каждую пробирку прибавляют по 5 мл раствора крахмала и по 2,5 мл раствора слюны, разведенной в 250 раз. Раствор слюны следует приливать, начиная с первой пробирки и через равные (полминуты) промежутки времени. Содержимое каждой пробирки после прибавления слюны тщательно перемешивают и оставляют стоять на 15—20 минут.

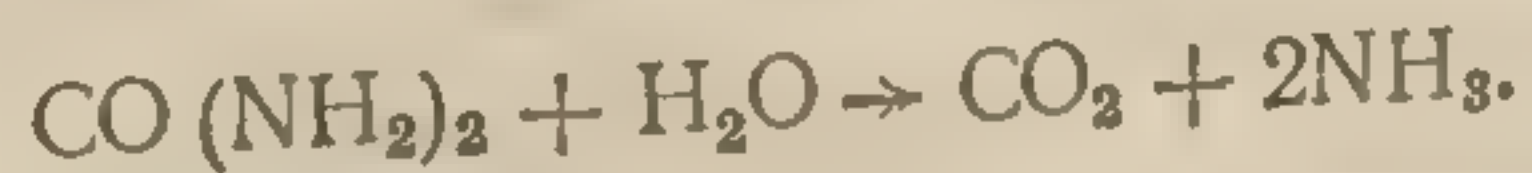
3. По прошествии 15—20 минут берут через каждую минуту пробы (несколько капель) из пятой пробирки и переносят их в пробирки с 1—2 каплями раствора иода. Вначале обычно получается синее окрашивание, затем фиолетовое, фиолетово-красное и красное.

4. Когда содержимое пятой пробирки будет давать красное окрашивание, через 1—2 минуты приливают во все пробирки по 2—3 капли раствора иода и взбалтывают. Приливание раствора иода ведут, начиная с первой пробирки, через равные промежутки времени (полминуты).

На основании полученной окраски можно судить о степени расщепления крахмала в зависимости от pH. Там, где получилась слабозеленая окраска, крахмал расщепился полностью и, следовательно, pH был оптимальным; там, где окраска красная, крахмал расщепился в меньшей степени, значит, pH был менее благоприятным для действия амилазы. Фиолетово-красное, фиолетовое и, наконец, синее окрашивание указывает соответственно на еще меньшую степень расщепления крахмала и демонстрирует влияние pH на действие амилазы.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА УРЕАЗУ

Уреаза — фермент, гидролизующий мочевину по уравнению:



Уреаза содержится в некоторых бактериях, много уреазы в бобах сои.

При стоянии мочи в ней развиваются бактерии, содержащие уреазу, от действия которой мочевина начинает выделять аммиак, и моча становится щелочной (аммиачное брожение мочи).

Уреазой из соевых бобов можно пользоваться для качественного определения мочевины в моче. Для этого обра-

зующийся из мочевины аммиак поглощают в отмеренный объем титрованной кислоты. Так как две молекулы аммиака соответствуют одной молекуле мочевины, то по количеству выделенного аммиака можно установить количество мочевины в исследуемой моче.

Уреаза является очень устойчивым ферментом и активна в довольно широких пределах рН. Оптимум ее действия находится близко к нейтральной среде.

П р и б о р ы. Штатив с пробирками.

Р е а к т и в ы. 1. Мочевина, 2% раствор (или моча).
2. Соевая мука.
3. Фенолфталеин, 0,1% раствор в спирте.

Х о д р а б о т ы

1. Наливают в пробирку 2—3 мл раствора мочевины или мочи и добавляют при помешивании около 0,5 г соевой муки.

2. Наблюдают (можно при комнатной температуре) через несколько минут выделение аммиака, что узнается по запаху и по покраснению содержимого пробирки от прибавления в нее нескольких капель фенолфталеина.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ОКСИДАЗЫ

Оксидазы — ферменты, катализирующие окисление субстрата свободным кислородом.

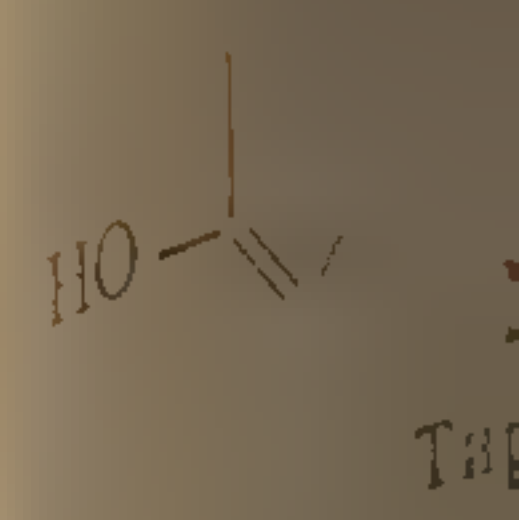
К числу наиболее типичных оксидаз следует отнести тирозиназу. Окисление под действием этого фермента приводит к превращению тирозина в темно окрашенные вещества, родственные естественным пигментам (меланинам) кожи, волос и т. д.

Превращение под влиянием тирозиназы тирозина и других производных фенола в меланиноподобные вещества идет в три стадии:

1. Окисление с образованием пигмента, окрашенного в красный цвет.
2. Обесцвечивание полученного пигмента.
3. Окисление кислородом воздуха образовавшегося вещества в меланиноподобное вещество.

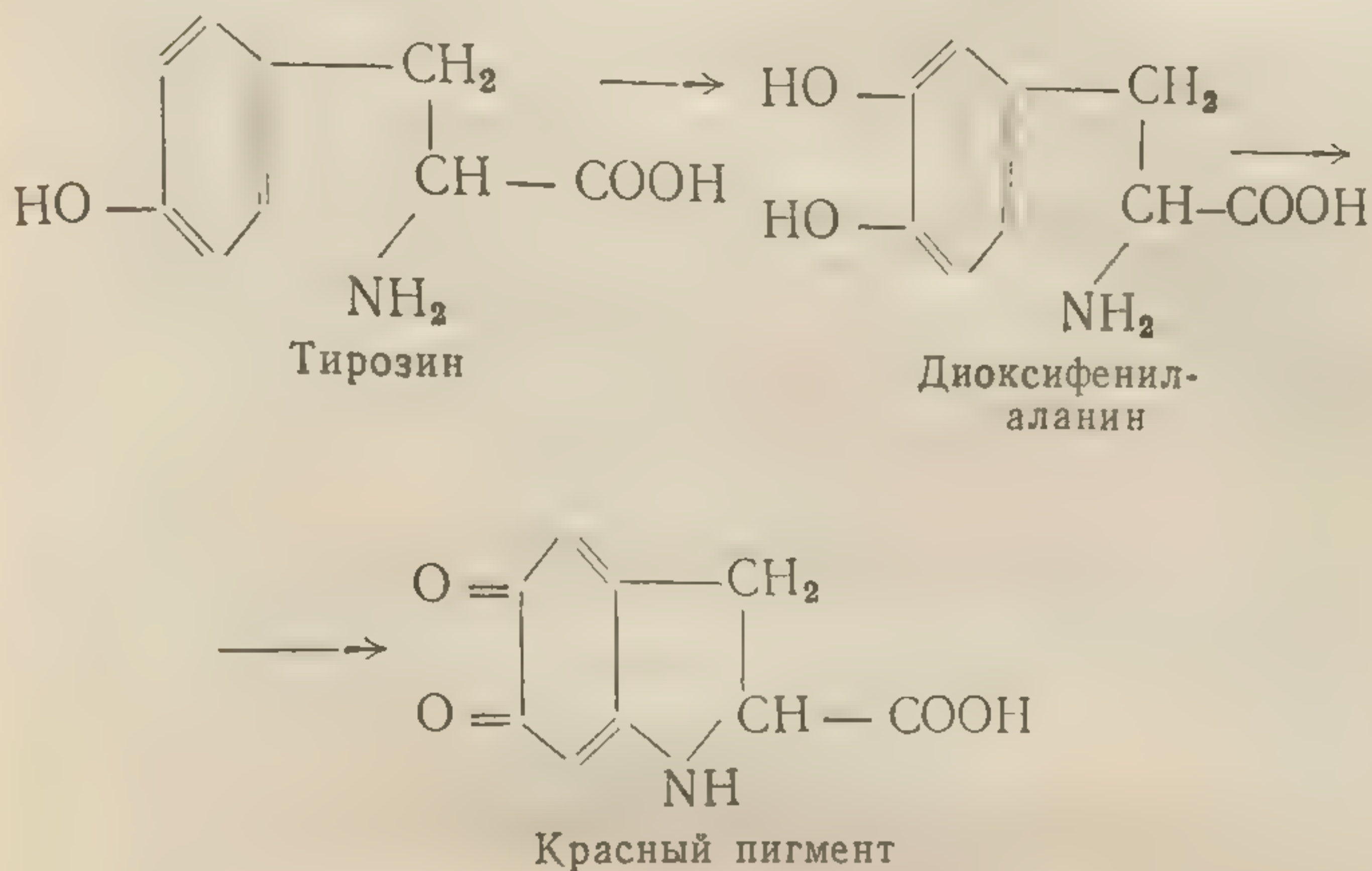
Первая стадия превращения нуждается в наличии фермента; вторая и третья не нуждаются в этом, так как представляют собой не ферментативные реакции.

Ферментативная
Жизнь студента



Тирозиназа
(внешние слои
злаков и др.)
Оптимум
лочной среды
С помощью
вить окисле
щейся в гва
явлением си
К оксида
хром за счет
Этот фермен
дыхания по
прочно связ
В состав цит
щая группа
Прежде, ког
точно изуче
ным фермент
Цитохром
ноловой сини
«Нади»).

Ферментативная стадия процесса может быть изображена следующим образом:



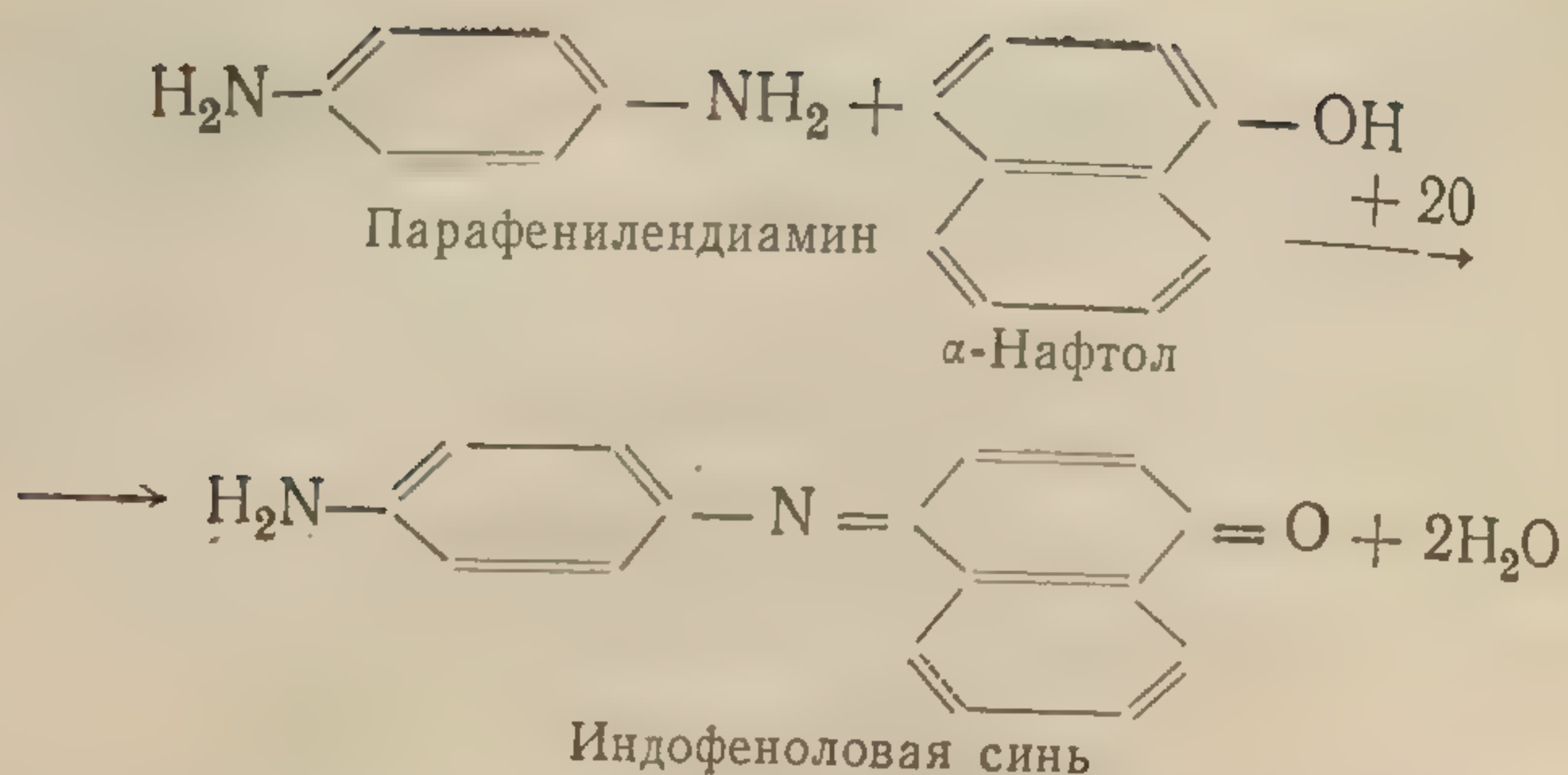
Тирозиназа содержится в свежих грибах, картофеле (внешние слои картофеля клубня), в сахарной свекле, злаках и других объектах.

Оптимум действия тирозиназы находится в слабо щелочной среде.

С помощью оксидаз типа тирозиназы можно осуществить окисление гваяковой смоляной кислоты, находящейся в гваяковой смоле, в озонид, что сопровождается появлением синего окрашивания.

К оксидазам относится также фермент, окисляющий цитохром за счет кислорода воздуха — цитохромоксидаза. Этот фермент является важнейшим звеном кислородного дыхания почти всех живых тканей. Цитохромоксидаза прочно связана с водонерастворимой структурой мышцы. В состав цитохромоксидазы входит железосодержащая группировка геминового типа. Прежде, когда дыхательные процессы еще не были достаточно изучены, цитохромоксидазу называли дыхательным ферментом Варбурга.

Цитохромоксидаза катализирует образование индофеноловой сини из парафенилендиамина и α -нафтола (реактив «Нади»).



Так как эта реакция получила широкое распространение при исследовании дыхательного фермента, то цитохром-оксидазу нередко называют также «индофеноксидазой».

- Приборы.
1. Штатив с пробирками.
 2. Ступка с пестиком.
 3. Нож.
 4. Воронка.
 5. Водяная баня.
 6. Термометр.
 7. Фильтровальная бумага.
 8. Пипетка.

- Реактивы.
1. Картофельный клубень, сырой.
 2. Картофельный клубень, вареный.
 3. Раствор тирозина (приготовление см. стр. 330, п. 43).
 4. Гваяковая смола, спиртовой раствор (приготовление см. стр. 322, п. 10).
 5. Мышечная кашица, отмытая (приготовление см. стр. 326, п. 23).
 6. Реактив «Нади» (приготовление см. стр. 331, п. 47).

Ход работы

Тирозиназа

I. 1. Чистый сырой картофельный клубень очищают ножом от кожуры. Верхние слои клубня кусочками нарезают в ступку.

2. Добавляют около 10 мл дистиллированной воды, растирают содержимое ступки и фильтруют.

3. Наливают в пробирку 2—3 мл раствора тирозина, добавляют 1—2 мл отфильтрованной водной вытяжки из картофеля, встряхивают и ставят пробирку в водяную баню при 35—40°.

4. Время от времени встряхивают пробирку для лучшего соприкосновения раствора с кислородом воздуха. Окраска постепенно становится розовато-красной, бурой и, наконец (приблизительно через 1—2 часа), переходит в черную.

II. 1. На срез сырого картофеля наносят каплю раствора гваяковой смолы. Происходит посинение, более интенсивное у краев среза клубня, около кожуры.

2. Наносят каплю раствора гваяковой смолы на срез вареного картофеля. Посинения не происходит, так как в вареном картофеле оксидазы, как и другие ферменты, инактивированы нагреванием при варке.

Цитохромоксидаза

1. Складывают кусок фильтровальной бумаги в 3—4 слоя.

2. Около 1 г мышечной кашицы растирают в ступке с 10—15 мл воды. Воду осторожно сливают, а кусочек отмытой мышцы переносят на фильтровальную бумагу.

3. Для контроля такую же порцию мышечной кашицы промывают кипящей водой, инактивируя таким образом цитохромоксидазу. Кусочек мышцы, отмытой горячей водой, также помещают на фильтровальную бумагу.

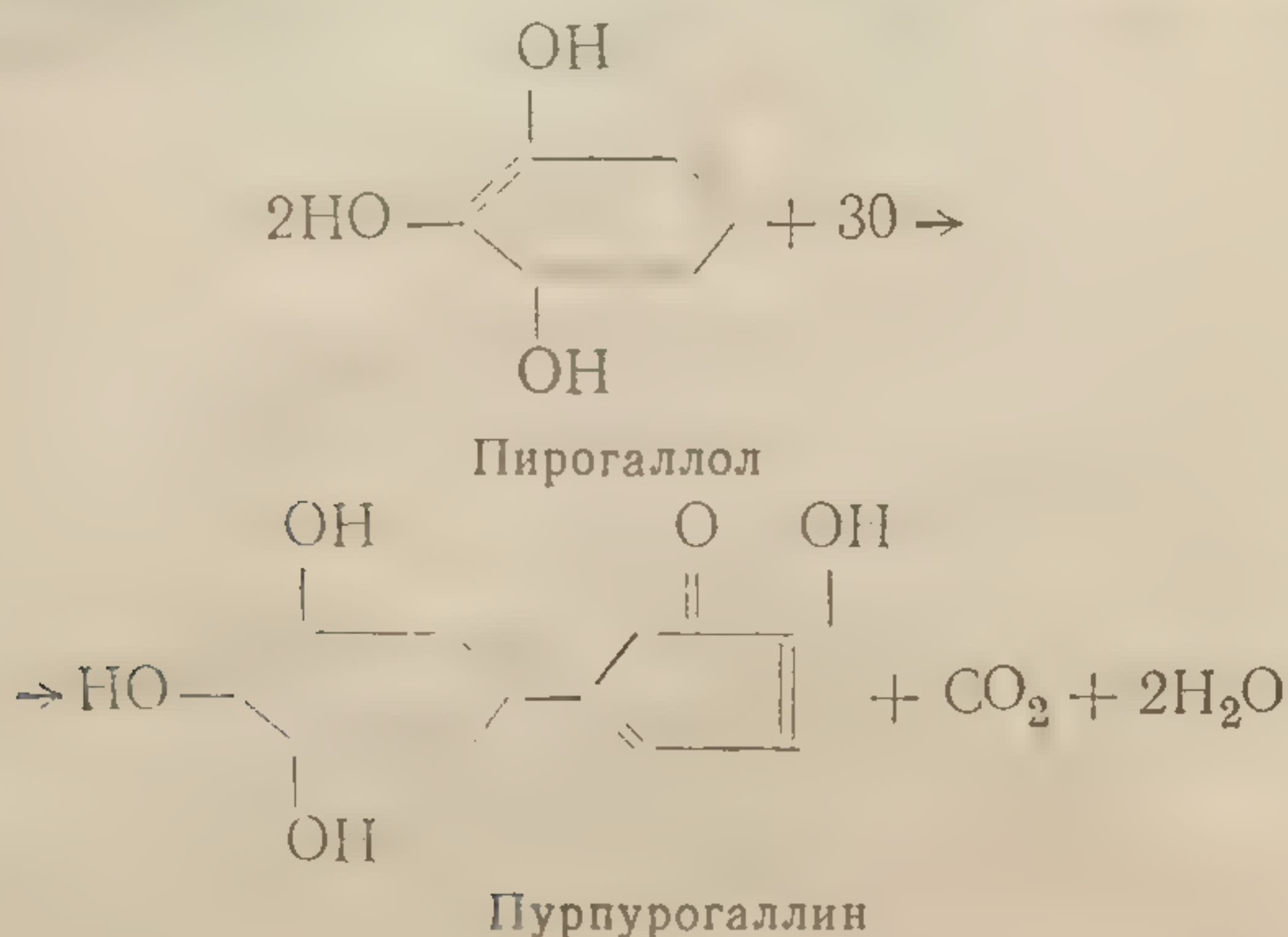
4. Наносят на каждую пробу мышечной кашицы по 2—3 капли реактива «Нади». На мышце, отмытой холодной водой, появляется сине-фиолетовое окрашивание (индофеноловая синь).

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ПЕРОКСИДАЗУ

Пероксидазы — ферменты, вызывающие окисление ряда веществ за счет кислорода перекиси водорода или других перекисей. Пероксидазы содержатся как в растительных, так и в животных организмах.

Реакциями на присутствие пероксидаз служат: 1) реакция окисления растворимого в воде пирогаллола

в бурый нерастворимый и выпадающий в осадок пурпурогаллин:



2) реакция окисления гваяковой смоляной кислоты, находящейся в гваяковой смоле, в озонид гваяковой смоляной кислоты синего цвета.

П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.

2. Пипетка на 2 мл.

3. Пипетка на 1 мл.

Р е а к т и в ы.

1. Пирогаллол, 1% раствор.

2. Перекись водорода, 2% раствор.

3. Вытяжка из хрена (приготовление см. стр. 322, п. 8).

4. Гваяковая смола, спиртовой раствор (приготовление см. стр. 322, п. 10).

Ход работы

1. 1. Наливают в пробирку около 5 мл вытяжки из хрена, кипятят содержимое пробирки в продолжение 2—3 минут и охлаждают.

2. В четыре пробирки наливают по 2—3 мл раствора пирогаллола.

3. Добавляют в первую пробирку 2 капли раствора перекиси водорода и 2 мл дистиллированной воды, во вторую пробирку — 2 мл некипяченой вытяжки из хрена, в третью пробирку — 2 капли раствора перекиси водорода и 2 мл некипяченой вытяжки из хрена, в четвертую пробирку —

2 капли раствора перекиси водорода и 2 мл предварительно прокипяченной вытяжки из хрена.

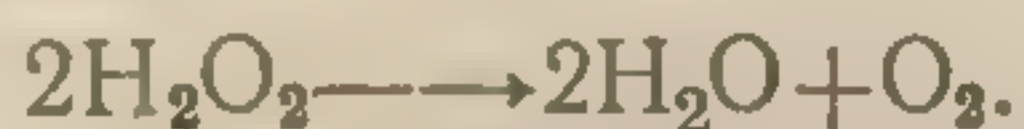
4. Взбалтывают и наблюдают за изменением цвета (побурение) и появлением осадка.

II. 1. В пробирку наливают около 0,5 мл раствора гваяковой смолы и около 0,5 мл раствора перекиси водорода. Добавляют несколько капель вытяжки из хрена. Получается синее окрашивание.

2. Повторяют эту реакцию с прокипяченной вытяжкой из хрена. Реакция будет отрицательная, т. е. синего окрашивания не получится, так как пероксидаза здесь инактивирована кипячением.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА КАТАЛАЗУ

К а т а л а з а — фермент, разлагающий перекись водорода по уравнению:



Каталаза широко распространена и содержится в большем или меньшем количестве во всех тканях и жидкостях организма. Биологическая роль каталазы заключается, повидимому, в разрушении вредной для организма перекиси водорода, которая накапливается в тканях при окислительных процессах.

П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.
2. Стакан с водой.
3. Лучинка или кусок пробки на проволочке.

Р е а к т и в ы. 1. Перекись водорода, 2% раствор.
2. Свежерастертая печень (кролика, крысы, лягушки или другого животного).

Х о д р а б о т ы

1. В пробирку помещают 0,3—0,5 г растертой печени. Добавляют около 10 мл воды и перемешивают содержимое.

2. Быстро наливают раствор перекиси водорода до верха пробирки и сейчас же, закрыв пробирку пальцем, опрокидывают ее в стакан с водой, не выливая жидкости. Наблюдают выделение газа (кислорода) в пробирке и вытеснение им жидкости в стакан.

3. Закрыв пробирку пальцем, осторожно вынимают ее из воды, переворачивают и быстро вносят в пробирку

тлеющую лучинку или тлеющую пробку на проволочке. Разгорание лучинки (или пробки) указывает на то, что выделившийся газ является кислородом.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ДЕГИДРАЗЫ

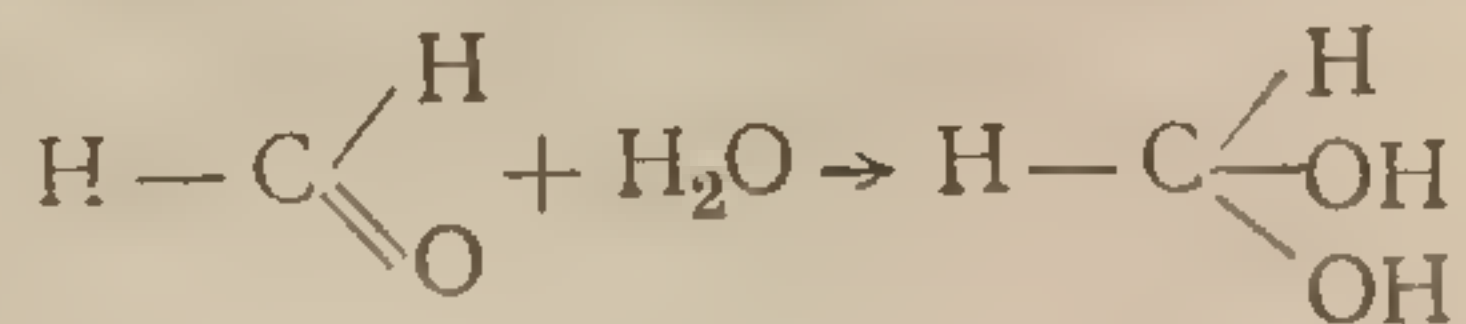
Дегидразами называют ферменты, катализирующие окисление различных веществ путем отнятия от них водорода (дегидрирование), откуда и название этих ферментов.

Окисление веществ под действием дегидраз происходит без участия кислорода (анаэробное окисление). Дегидразой водород передается другим веществам, называемым акцепторами водорода¹; само же окисляемое вещество при этом отдает водород и является донатором водорода.

Действие дегидраз можно наблюдать на примере дегидразы молока и сукциндегидразы мышц.

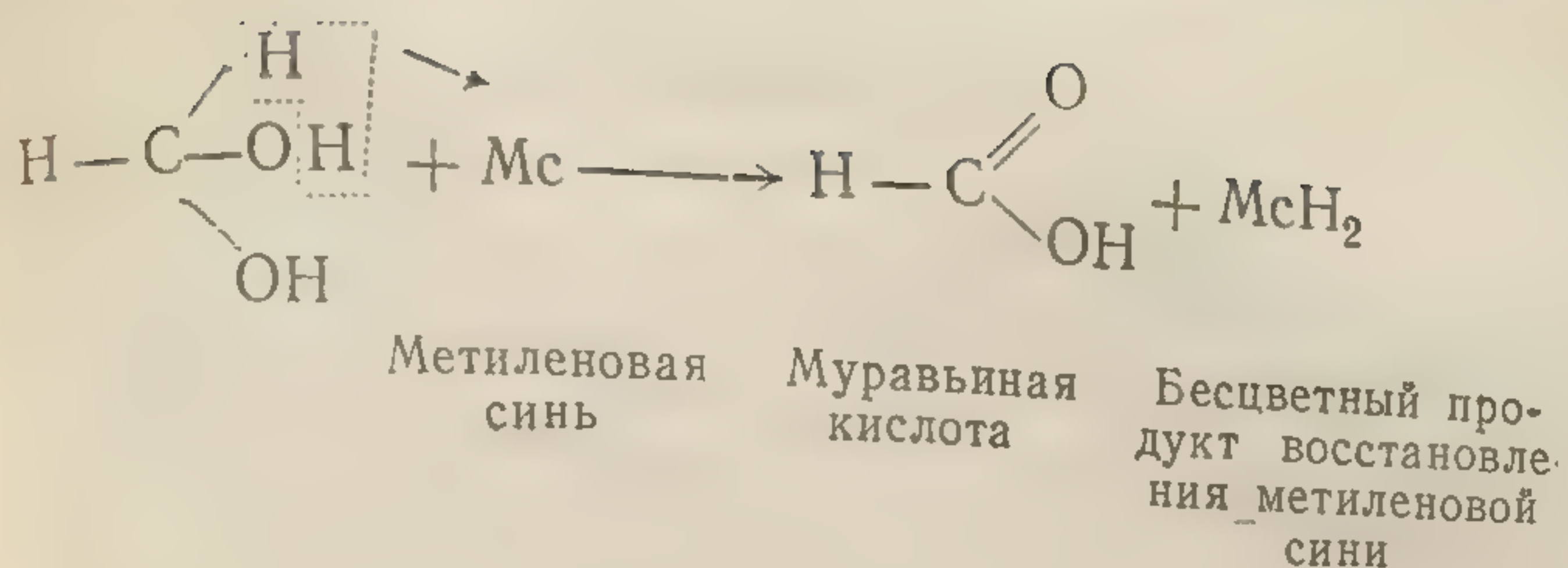
Дегидраза молока способна окислять ряд субстратов. Согласно современным данным, ее следует рассматривать как ксантиндегидразу, т. е. фермент, окисляющий ксантин в мочевую кислоту (см. стр. 213). Дегидраза молока относительно устойчива к действию температуры; ее действие поэтому лучше наблюдать при температуре около 70°.

Если в качестве субстрата окисления (донатора водорода) взять формальдегид, а в качестве акцептора водорода — метиленовую синь и оба эти вещества прибавить к молоку, то под действием дегидразы молока происходит окисление муравьиного альдегида путем отнятия водорода, который присоединяется к метиленовой сини, восстанавливая этот краситель в бесцветное соединение (лейкооснование). В виде схемы происходящие при этом реакции можно изобразить следующим образом:

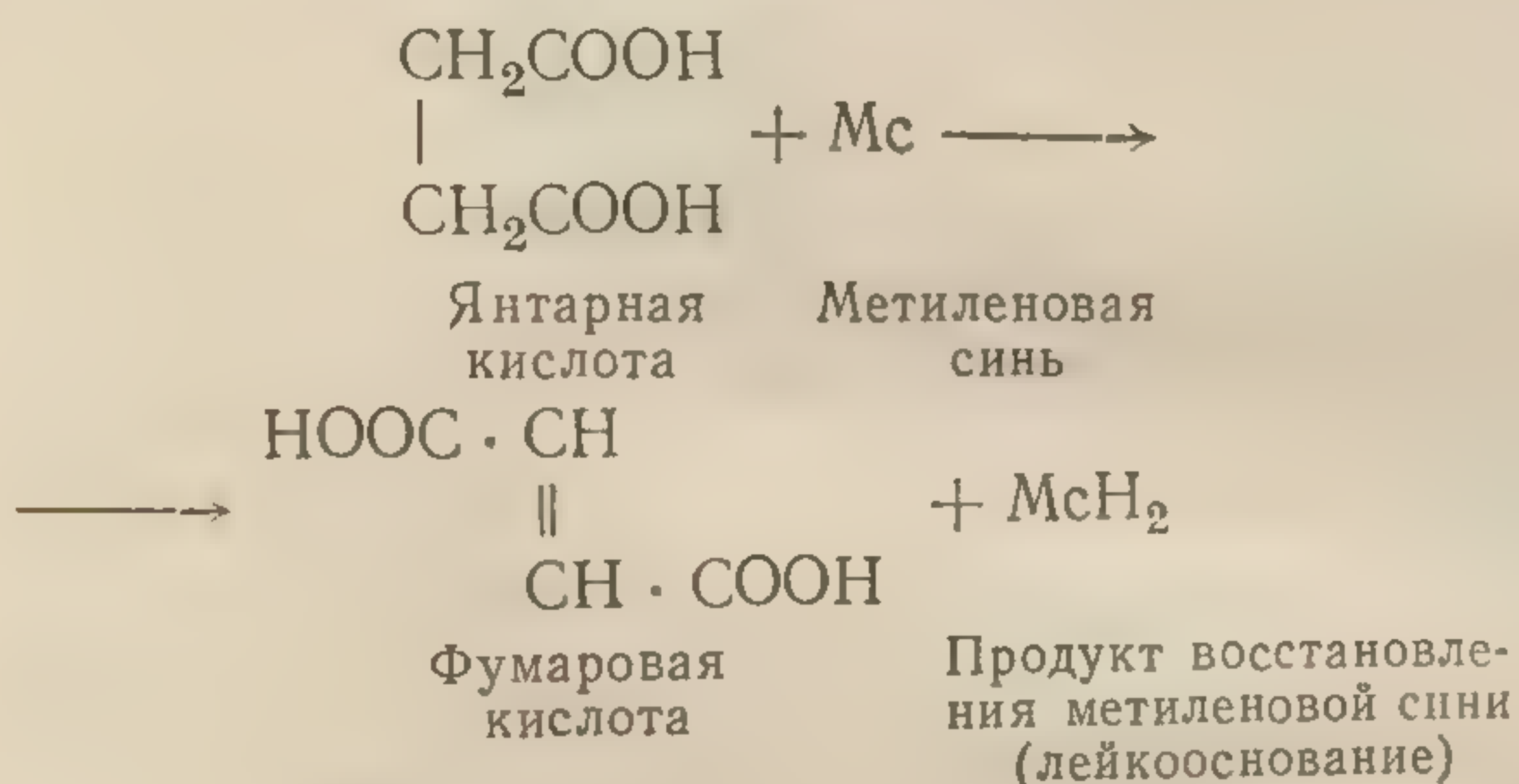


Гидратная форма
формальдегида

¹ Процесс биологического окисления за счет отнятия водорода (дегидрирование) был открыт В. И. Палладиным.



Сукциндегидраза дегидрирует янтарную кислоту, окисляя ее в фумаровую. Поэтому в присутствии сукциндегидразы, янтарной кислоты и метиленовой сини происходит восстановление (обесцвечивание) метиленовой сини.



П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.
2. Водяная баня.
3. Термометр.

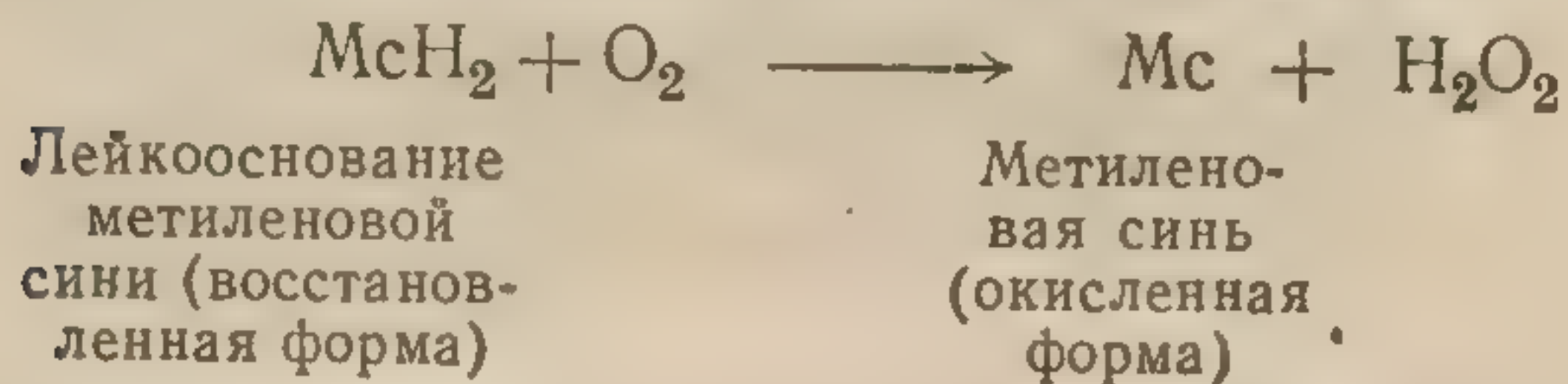
Р е а к т и в ы. 1. Свежее коровье молоко¹.
2. Мышечная кашица, отмытая (приготовление см. стр. 326, п. 23).
3. Формальдегид, 0,4% раствор.
4. Метиленовая синь, 0,01% раствор.
5. Янтарная кислота, 3% раствор, нейтрализованный едким натром и доведенный до слабо щелочной реакции на лакмус.

¹ Следует иметь в виду, что молоко, поступающее в продажу, часто не содержит дегидразы вследствие пастеризации.

Ход работы

I. 1. Наливают в две пробирки по 4—5 мл молока. Содержимое второй пробирки кипятят, а потом охлаждают. Добавляют в обе пробирки по 8—10 капель раствора формальдегида и по 1—2 капли раствора метиленовой сини, взбалтывают и ставят в водяную баню при 70°. Через некоторое время наблюдают обесцвечивание метиленовой сини в первой пробирке и отсутствие обесцвечивания во второй пробирке.

2. После обесцвечивания первую пробирку сильно взбалтывают. Синее окрашивание появляется вновь вследствие окисления лейкооснования метиленовой сини за счет передачи его водорода кислороду воздуха:



Если пробирку снова поставить в водяную баню, то метиленовая синь вновь обесцветится. Эту операцию можно повторять много раз. Метиленовая синь является при этом переносчиком водорода, и небольшое количество ее может окислить много формальдегида.

II. 1. Помещают в две пробирки по 3—4 мл мышечной кашицы. В первую пробирку добавляют около 0,5 мл нейтрализованного раствора янтарной кислоты.

2. В обе пробирки добавляют по 2 капли раствора метиленовой сини, встряхивают и ставят в баню при 37°. Через некоторое время наблюдают обесцвечивание метиленовой сини в первой пробирке и отсутствие обесцвечивания во второй пробирке.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕГИДРАЗ МЫШЦ

Для определения степени активности фермента обычно или отмечают время, необходимое для превращения определенного количества субстрата, или устанавливают количество субстрата, измененного ферментом в данный промежуток времени.

Количественное определение дегидраз основано на описанной выше реакции обесцвечивания метиленовой сини. Мерой активности дегидразы является **с к о р о с т ь**

обесцвечивания в анаэробных условиях. В зависимости от добавленного субстрата (янтарная кислота, глицерофосфат и др.) измеряется активность тсй или иной специфической дегидразы.

Приводим способ количественного определения дегидраз, не требующий вакуумных пробирок и насоса.

Приборы. 1. Штатив с пробирками.

2. Водяная баня.

3. Термометр.

4. Пипетки.

5. Стакан со льдом.

Реактивы. 1. Метиленовая синь, 0,01% раствор.

2. Янтарная кислота, 0,02 м. раствор, нейтрализованный на лакмус.

3. Глицерофосфат натрия, 0,02 м. раствор, нейтрализованный на лакмус.

4. Агар, 2% раствор в 0,5% растворе K_2HPO_4 , нейтрализованный до рН 7,0 (перед употреблением расплавляют и охлаждают до 45°).

5. Мышечная кашица (приготовление см. стр. 326, п. 24).

Ход работы

1. Часть мышечной кашицы (около 5 мл) помещают в пробирку в кипящую водяную баню на 10—15 минут.

2. В две пробирки (№ 1 и 2) наливают по 0,5 мл раствора янтарной кислоты, а в третью пробирку (№ 3) — 0,5 мл раствора глицерофосфата.

3. В каждую пробирку прибавляют по 1 мл метиленовой сини и по 2 мл раствора агара.

4. Добавляют в пробирки № 1 и № 3 по 3 мл мышечной кашицы и в пробирку № 2 3 мл предварительно прокипяченной мышечной кашицы.

5. Перемешивают содержимое каждой пробирки и охлаждают все пробирки во льду до затвердения агара (1—2 минуты).

6. Одновременно ставят все три пробирки в водяную баню при 37° и отмечают время обесцвечивания метиленовой сини.

В пробирке № 1 обесцвечивание происходит скорее всего, так как сукциндегидраза в этих условиях наиболее активна. В пробирке № 3 обесцвечивание требует больше времени, а в пробирке № 2, где сукциндегидраза разрушена нагреванием, обесцвечивания вовсе не происходит.

Обесцвечивание раньше всего наступает в нижней части пробирки. В верхней части агара, вследствие диффузии кислорода воздуха, остается синяя зона (2—3 мм), образующая контраст с обесцвеченной областью внизу.

* КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТЕИНАЗ ПО СПОСОБУ МЕТТА

Активность протеиназ (ферментов, расщепляющих белки) может быть измерена путем определения нарастания концентрации продуктов распада белка (по освобождающимся карбоксильным или аминным группам) (см. стр. 37 и 184).

Эти способы, однако, требуют много времени, труда и специальной аппаратуры.

С. Г. Меттом (в лаборатории И. П. Павлова) был разработан простой метод определения активности протеиназ, применяемый главным образом для определения переваривающей силы пищеварительных соков.

Способ Метта вполне пригоден для клинических целей.

Принцип определения заключается в измерении количества растворенного (переваренного) яичного белка, предварительно коагулированного в стеклянной трубке.

- Приборы.**
1. Два стакана на 50—100 мл.
 2. Термостат.
 3. Термометр.
 4. Шкала (с миллиметровыми делениями).
 5. Лупа.

- Реактивы.**
1. Трубки Метта с коагулированным яичным белком (приготовление см. стр. 332, п. 58).
 2. Желудочный сок или 0,1% раствор пепсина в 0,2% соляной кислоте (приготовление см. стр. 327, п. 30).

1. В ... стакан
... или раствора ...
того же желудочного
... разведени
2. Помещают в
трубки длиной ско
при 37° на 2—4 су
3. На следующе
вают их водой и изм
(в миллиметрах) п
белка.

Берут среднюю
Согласно прави
ного белка пропор
чества пепсина.
столбика перевар
растворе пепсина,
вдвое меньше, че

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Амилазную а
в количест
расщепляе
определен
(например,
нахождении м
котором иссле
крахмал д
При опреде
наблюдать так
рализаторов (и
рий в разве
ствие а м
Растворы сер
замедляю
Количествен
в клинической
очень мало ами
лезы. Количес
татах, заболева

Ход работы

1. В один стакан наливают около 20 мл желудочного сока или раствора пепсина, в другой стакан — около 20 мл того же желудочного сока (или раствора пепсина), предварительно разведенного в четыре раза.

2. Помещают в каждый стакан по 1—2 меттовских трубки длиной около 2 см и ставят стаканы в термостат при 37° на 2—4 суток (до следующего занятия).

3. На следующем занятии вынимают трубки, ополаскивают их водой и измеряют по шкале с помощью лупы длину (в миллиметрах) переваренного (растворенного) столбика белка.

Берут среднюю величину для каждого раствора.

Согласно правилу Борисова, длина участка переваренного белка пропорциональна квадратному корню из количества пепсина. Таким образом, в нашем случае длина столбика переваренного белка в желудочном соке или растворе пепсина, разведенном в четыре раза, должна быть вдвое меньше, чем в неразведенном.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СЛЮНЫ И МОЧИ

Амилазную активность слюны или мочи выражают в количестве субстрата (крахмала), расщепляемого 1 мл слюны или мочи за определенный промежуток времени (например, 30 минут). Определение основано на нахождении максимального разведения, при котором исследуемая жидкость еще расщепляет крахмал до стадии красного окрашивания с иодом.

При определении амилазной активности слюны можно наблюдать также влияние на ферменты активаторов и пассиваторов (ингибиторов). Так, хлористый натрий в разведенных растворах ускоряет действие амилазы слюны на крахмал. Растворы сернокислой меди, наоборот, сильно замедляют действие амилазы слюны.

Количественным определением амилазы пользуются и в клинической практике. В норме моча человека содержит очень мало амилазы, происходящей из поджелудочной железы. Количество амилазы в моче повышается при панкреатитах, заболеваниях желчных путей и др. При почечной

недостаточности амилаза в моче отсутствует. Таким образом, количественное определение амилазы в моче может иметь диагностическое значение.

- П р и б о р ы.**
1. Штатив с пробирками.
 2. Две бюретки.
 3. Пипетка на 1 мл.
 4. Водяная баня.
 5. Термометр.

- Р е а к т и в ы.**
1. Свежая слюна, разведенная в десять раз и профильтрованная.
 2. Крахмал, 0,1% раствор (без хлористого натрия), свежеприготовленный.
 3. Раствор иода в иодистом калии (приготовление см. стр. 329, п. 39).
 4. Хлористый натрий, 0,85% раствор.
 5. Сернокислая медь, 1% раствор.

Х о д р а б о т ы

I. Определение амилазной активности слюны

1. Наливают из бюретки в 10 пронумерованных пробирок по 1 мл дистиллированной воды.

2. В первую пробирку отмеривают 1 мл слюны, разведенной водой в десять раз.

3. Перемешивают содержимое первой пробирки путем троекратного втягивания пипеткой жидкости из пробирки и последующего выпуска из пипетки. 1 мл полученного раствора переносят из первой пробирки во вторую.

4. Перемешивают таким же образом содержимое второй пробирки и переносят 1 мл из второй пробирки в третью и т. д. Этим способом получают ряд разведений. Концентрация фермента в каждой последующей пробирке в два раза меньше, чем в предыдущей.

Из десятой пробирки 1 мл жидкости как излишний выливают.

5. Наливают во все десять пробирок еще по 1 мл дистиллированной воды.

6. Далее наливают из бюретки во все десять пробирок (начиная с десятой, потом в девятую и т. д.) по 2 мл раствора крахмала и перемешивают содержимое каждой пробирки.

Добавление крахмала нужно производить с пробирки, содержащей наименьшую концентрацию амилазы, так как в ней расщепление на холоду идет очень медленно и ошибка за счет неодновременного прибавления субстрата практически не отразится на результатах определения.

7. Одновременно помещают все десять пробирок в нагретую до 37° водяную баню.

8. Через 30 минут вынимают пробирки из бани, быстро охлаждают их током холодной воды, перемешивают содержимое каждой пробирки и ставят по порядку в штатив.

9. Прибавляют в каждую пробирку по две капли раствора иода, перемешивают и наблюдают в пробирках гамму цветов от желтого к синему. Желтый цвет свидетельствует об отсутствии крахмала, красноватый — о присутствии промежуточных продуктов расщепления — различных декстринов, синий — о присутствии крахмала или продуктов его начального расщепления.

10. Вычисляют амилазную активность исследуемой слюны. При этом исходят из следующего. В пробирке, где жидкость окрашена еще в синий цвет, должного расщепления крахмала не произошло. Достаточное расщепление крахмала, очевидно, имеет место в той пробирке, где нет синего оттенка. Пусть, например, это будет пятая пробирка (в шестой пробирке уже имеется синий оттенок). В пятой пробирке неразведенной слюны было $1/320$ мл, т. е. мы можем написать:

$\frac{1}{320}$ мл слюны	расщепляет	2 мл 0,1% раствора крахмала
1 »	»	x » 0,1% »

$$x = \frac{2 \cdot 1}{\frac{1}{320}} = 640.$$

т. е.

Следовательно, 1 мл неразбавленной слюны расщепляет за 30 минут при 37° 640 мл 0,1% раствора крахмала. Это принято изображать следующим образом:

d (диастаза) $\frac{37^{\circ}}{30'} = 640$ единицам (для данного случая).

Для выявления активирующего влияния хлористого натрия и парализующего влияния сернокислой меди при

гидролизе крахмала амилазой поступают следующим образом.

Производят с одной и той же разведенной слюной три серии определений: 1) по вышеизложенному, 2) беря вместо 1 мл дистиллированной воды (п. 5) по 1 мл раствора хлористого натрия и 3) беря вместо 1 мл дистиллированной воды (п. 5) по 1 мл раствора сернокислой меди.

При сравнении результатов всех трех определений обнаруживается разница в активности амилазы.

II. Определение амилазной активности мочи

Моча значительно беднее амилазой, чем слюна. В связи с этим условия определения активности несколько изменены. Берут десять пронумерованных пробирок, приливают в каждую по 1 мл физиологического (0,85%) раствора хлористого натрия. Далее в первую пробирку приливают 1 мл исследуемой мочи, перемешивают содержимое пробирки и 1 мл смеси переносят во вторую пробирку и т. д. Из десятой пробирки выливают 1 мл смеси. Таким образом, получают разведения мочи в геометрической прогрессии. Далее, в каждую пробирку наливают по 1 мл физиологического раствора, по 2 мл раствора крахмала и, взболтав, все пробирки ставят на 15 минут в баню точно при 45° . Дальнейшие операции и расчет ведут, как и при работе со слюной (с пункта 8).

Моча здоровых людей обычно имеет $d \frac{45^{\circ}}{15'}$, равное 16—64 единицам.

* КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАТАЛАЗЫ КРОВИ ПО БАХУ И ЗУБКОВОЙ

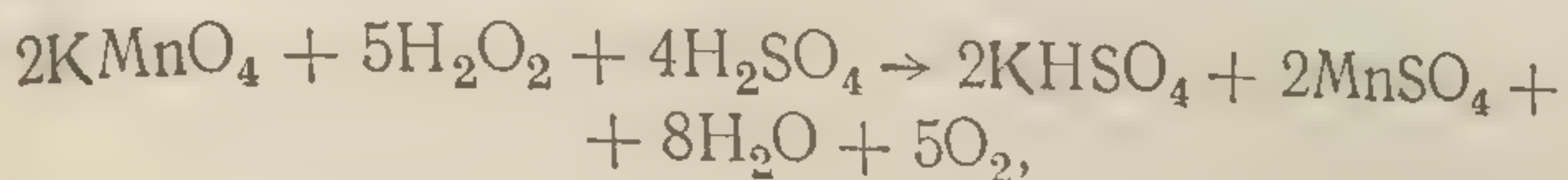
Каталаза содержится в большом количестве в красных кровяных шариках человека и животных.

Количество каталазы в данной ткани или жидкости можно определить путем измерения либо количества перекиси водорода, разложенного каталазой, либо количества кислорода, выделенного при этой реакции.

Количественное определение каталазы в крови сводится к определению так называемых «каталазного числа» и «показателя каталазы».

Каталазным числом называют количество миллиграммов H_2O_2 , которое разлагается 1 мл (1 микролитр

равен 1 кубическому миллиметру) исследуемой крови. Принцип определения каталазного числа основывается на следующей реакции:



т. е. о количестве разрушенной перекиси водорода судят по разности количеств марганцовокислого калия, израсходованного на титрование до и после действия каталазы.

Показателем каталазы называют дробь, в которой числителем является каталазное число, а знаменателем число миллионов красных кровяных телец в 1 мл исследуемой крови.

Следует сравнивать показатели каталазы, а не каталазные числа, так как каталаза крови содержится почти исключительно в эритроцитах и притом не в гемоглобине, а в строме.

Ниже приводится описание определения каталазного числа. Определение числа красных кровяных телец можно найти в практикумах по физиологии.

Содержание каталазы в крови снижается при ряде заболеваний, в особенности сопровождающихся кахексией.

Снижение каталазы крови характерно для рака, анемии, туберкулеза.

П р и б о р ы.

1. Мерная колба на 100 мл.
2. Две конические колбочки.
3. Микропипетка на 0,1 мл.
4. Пипетка на 10 мл с делениями.
5. Пипетка на 1 мл.
6. Пипетка на 2 мл.
7. Игла для взятия крови.
8. Вата.
9. Марля.
10. Бюретка.

Р е а к т и в ы.

1. Перекись водорода, 1% раствор.
2. Серная кислота, 10% раствор.
3. Марганцовокислый калий, 0,1 н. раствор (для кислой среды).
4. Этиловый спирт.
5. Диэтиловый эфир.

Игла для взятия крови должна быть вымыта спиртом и осушена эфиром (осторожно! Не зажигать огня!). Для исследования можно брать как кровь животного, так и кровь человека. В последнем случае кровь берут из безымянного пальца левой руки, для чего палец тщательно обмывают стерильной дистиллированной водой. Во время взятия крови следует иметь для вытирания сухую марлю или вату. Первую выступившую от удара иглы каплю осторожно стирают сухой марлей и выжидают появления новых капель, которые и набирают в микропипетку.

Одновременно со взятием крови для определения каталазного числа сосчитывают количество красных кровяных телец (см. практикумы по физиологии человека), что даст возможность определить в дальнейшем не только каталазное число, но и показатель каталазы. Следует помнить, что определение числа эритроцитов может сопровождаться рядом неправильных манипуляций, влекущих за собой ошибки при определении показателя каталазы. Так, изменение просветов капилляров уже может обуславливать значительные колебания в количестве эритроцитов, а следовательно, в величине показателя каталазы. Поэтому перед взятием крови палец не следует обмывать ни спиртом, ни эфиром, а только стерильной дистиллированной водой. По окончании взятия крови кончик пальца, откуда бралась кровь, завертывают в вату, смоченную эфиром, и прижимают палец к ладони.

Ход работы

1. Наливают около 10 мл дистиллированной воды в мерную колбу на 100 мл.

2. Вносят микропипеткой 0,1 мл исследуемой крови, предварительно обтерев кончик капилляра от приставшей снаружи крови. Пипетку промывают путем всасывания и выпускания обратно жидкости из мерной колбы.

3. Доливают мерную колбу водой до метки и замечают время, когда кровь была разведена.

Получается так называемый основной раствор крови (1 : 1 000), который используют для определения каталазного числа.

4. В две конические колбочки наливают по 7—8 мл дистиллированной воды и отмеривают в них по 1 мл основного раствора крови.

5. Содержимое одной из колбочек сейчас же кипятят в течение 2 минут для разрушения каталазы.

6. Обе колбочки оставляют стоять при комнатной температуре на 30 минут, считая с момента разведения крови.

7. В каждую колбочку вносят точно по 2 мл раствора перекиси водорода и вновь оставляют на 30 минут.

8. Приливают в каждую колбочку по 4—5 мл раствора серной кислоты и оттитровывают содержимое 0,1 н. раствором марганцовокислого калия до появления розового окрашивания.

Так как каталаза разлагает часть перекиси водорода, то на титрование первой колбочки пойдет меньше раствора марганцовокислого калия, чем на титрование содержимого второй колбочки, где каталаза была разрушена.

Эту разность умножают на 1,7 и получают каталазное число исследуемой крови.

Принцип вычисления будет ясен из следующего.

Грамм-эквивалент перекиси водорода равен 17 г. Следовательно, в 1 мл 0,1 н. раствора содержится 1,7 мг перекиси водорода. Так как 1 мл 0,1 н. раствора марганцовокислого калия соответствует 1 мл 0,1 н. раствора перекиси водорода, то, умножив 1,7 на разность между количествами миллилитров 0,1 н. раствора марганцовокислого калия, получают количество миллиграммов перекиси водорода, которое разлагается 1 мл исследуемой крови (для исследования бралось по 1 мл основного раствора, в 1 мл которого исследуемой крови было 1 мл), т. е. непосредственно получается каталазное число.

Если определялось также число красных кровяных телец, то для получения показателя каталазы составляют дробь, где числителем будет каталазное число, а знаменателем — число красных кровяных телец в миллионах в 1 мл исследуемой крови.

* КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИПАЗЫ

Фермент липаза гидролизует жиры на глицерин и жирные кислоты. Если образующиеся жирные кислоты нейтрализовать щелочью, то по количеству израсходованной щелочи можно судить о количестве распавшегося жира и, следовательно, об активности липазы.

Липаза активируется желчью, что также можно наблюдать в приводимой работе.

Приборы.

1. Небольшие колбочки 8 шт.
2. Пипетки на 5 мл с делениями.
3. Водяная баня.
4. Термометр.
5. Бюретка.

Р е а к т и в ы.

1. Подсолнечное масло.
2. Желчь, 10% раствор.
3. Вытяжка липазы (приготовление см. стр. 322, п. 6).
4. Едкий натр, 0,1 н. раствор.
5. Фенолфталеин, 0,1% раствор в спирте.

Ход работы

1. Отмеривают в четыре колбочки следующие количества (в миллилитрах) указанных ниже жидкостей.

	№ колбочки			
	1	2	3	4
Подсолнечное масло	2	2	2	2
Раствор желчи	—	—	6	6
Дистиллированная вода	6	6	—	2
Вытяжка липазы	2	—	2	—
Прокипяченная вытяжка липазы	—	2	—	—

Вытяжку липазы добавляют последней.

2. Взбалтывают содержимое каждой колбочки и сейчас же отбирают из всех четырех колбочек пробы по 5 мл и переносят их пипетками в другие четыре колбочки, помеченные теми же номерами.

Первые четыре колбочки ставят на водяную баню при 37—38° на 1 час.

3. К взятым контрольным пробам немедленно прибавляют по 2—3 капли раствора фенолфталеина и быстро оттитровывают 0,1 н. раствором щелочи до обесцвечивания.

4. Через час вынимают опытные пробы из водяной бани и таким же образом оттитровывают их.

5. Из полученных результатов (количества миллилитров щелочи, пошедшей на титрование) вычитают количество

В колбеске
липаза инактив
высшая актив
желчь).

*ФЕРМЕНТАТИВ

Ферменты м
правления я
может катализ
теза. В настоя
вие ферм
виях для ряд
Направлен
тативная реа
очередь от к
Синтетиче
в случае с
препарата и
эстераза (л

Р е а к т

6
Практикум

щелочи, пошедшее на титрование соответствующей контрольной пробы. Результат выражает количество щелочи, связанное жирными кислотами, освободившимися под действием липазы и таким образом может служить мерой ее активности.

Поясним сказанное следующим примером.

На нейтрализацию проб, находившихся в бане, пошло (с учетом контрольной пробы): колбочка № 1 $1,5 - 1 = 0,5$ мл; колбочка № 2, $1,1 - 1 = 0,1$ мл; колбочка № 3 $5,3 - 1,2 = 4,1$ мл; колбочка № 4 $1,1 - 1,1 = 0$ мл.

В колбочке № 2 расщепления практически нет, так как липаза инактивирована нагреванием. В колбочке № 3 высокая активность липазы; зависит от активации ее желчью.

* ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ИЗОАМИЛОМАСЛЯНОГО ЭФИРА

Ферменты могут ускорять реакции в обоих направлениях, т. е. в ряде случаев один и тот же фермент может катализировать и процесс распада, и процесс синтеза. В настоящее время синтетическое действие ферментов доказано в лабораторных условиях для ряда энзиматических процессов.

Направление, по которому может идти данная ферментативная реакция, зависит от многих условий и в первую очередь от концентрации реагирующих веществ.

Синтетическое действие фермента весьма демонстративно в случае синтеза изоамиломыльного эфира с помощью препарата из поджелудочной железы, в которой имеется эстераза (липаза).

П р и б о р ы. 1. Несколько небольших колбочек.

2. Пипетки на 5 мл.
3. Мерный цилиндр на 50 мл.
4. Водяная баня.
5. Термометр.
6. Бюретка.

Р е а к т и в ы. 1. Препарат поджелудочной железы (приготовление см: стр. 328, п. 33).

2. Изоамиловый спирт.
3. Масляная кислота.
4. Желчь.
5. Едкий натр, 0,1 н. раствор.
6. Фенолфталеин, 0,1% раствор в спирте.

Ход работы

1. Отвешивают в колбочку с притертой или каучуковой пробкой 0,5 г препарата панкреатической железы в порошке.

2. Добавляют 1 мл дистиллированной воды, 40 мл изоамилового спирта, 0,5 г масляной кислоты и 1—2 капли желчи для активирования липазы.

3. Тщательно перемешивают содержимое этой колбочки и ставят ее на 2—3 минуты в водяную баню при 38—40°.

4. Через 2—3 минуты вновь тщательно перемешивают содержимое колбочки и отмеривают из нее 5 мл в другую (вторую) колбочку. Первую колбочку с содержимым вновь ставят на полчаса на водяную баню при 38—40°.

5. Оттитровывают содержимое второй колбочки 0,1 н. раствором едкого натра в присутствии фенолфталеина при тщательном взбалтывании. По окончании титрования содержимое второй колбочки выливают и колбочку тщательно моют.

6. По прошествии получаса вновь отмеривают 5 мл из первой колбочки во вторую и вновь оттитровывают. Такое отмеривание и титрование производят еще через 1, 1½ и 2 часа.

7. Первую колбочку оставляют до следующего занятия. Затем, так же как прежде, отмеривают из нее 5 мл и оттитровывают.

8. Сравнивают результаты всех титрований. Количество 0,1 н. раствора щелочи, израсходованное на титрование, откладывают по времени в ординатах, получая кривую изменения титруемой кислотности. Уменьшение количества щелочи, идущей на титрование, говорит о синтезе изоамиломасляного эфира.

Вита
химическ
обходи
Входя

менее игра
ляясь сост
таким обр

Витами

стоящее в

и предста

Отсут

мина выз

рушений

нозов

Для м

веществ,

составно

Вита

и вод

природа

по букв

часто за

ческой

Гор

групп

ных

приро

внутр

никами,

в очень м

или иных

1 В С

В. Н. Бук

успехи в х

ВИТАМИНЫ И ГОРМОНЫ

В и т а м и н ы — это органические вещества различной химической природы, общей чертой которых является необходимость их в питании.

Входя в малых количествах в пищу, витамины тем не менее играют весьма важную роль в обмене веществ, являясь составной частью многих ферментов и осуществляя таким образом каталитические функции.

Витамины были открыты Н. И. Луниным в 1880 г. В настоящее время учение о витаминах выросло в целую науку и представляет собой важную область знания¹.

Отсутствие или недостаток в пище того или иного витамина вызывает ряд специфических и неспецифических нарушений обмена веществ, так называемых авитаминозов и гиповитаминозов.

Для многих витаминов изучены пути их участия в обмене веществ, а также показана роль некоторых витаминов как составной части простетической группы ферментов.

Витамины разделяют на жирорастворимые и водорастворимые. Прежде, когда химическая природа витаминов не была известна, их называли только по буквам латинского алфавита. Теперь эти обозначения часто заменяют названием вещества, исходя из его химической природы.

Гормоны, подобно витаминам, представляют собой группу биологически весьма активных веществ различной химической природы. Гормоны выделяются в кровь железами внутренней секреции (гипофизом, надпочечниками, щитовидной железой и др.) и оказывают действие в очень малых концентрациях. Недостаток или избыток тех или иных гормонов (нарушения внутренней секреции) вы-

¹ В Советском Союзе А. В. Палладиным, Б. А. Лавровым, В. Н. Букиным, Б. А. Кудряшовым и др. достигнуты большие успехи в химии и применении витаминов.

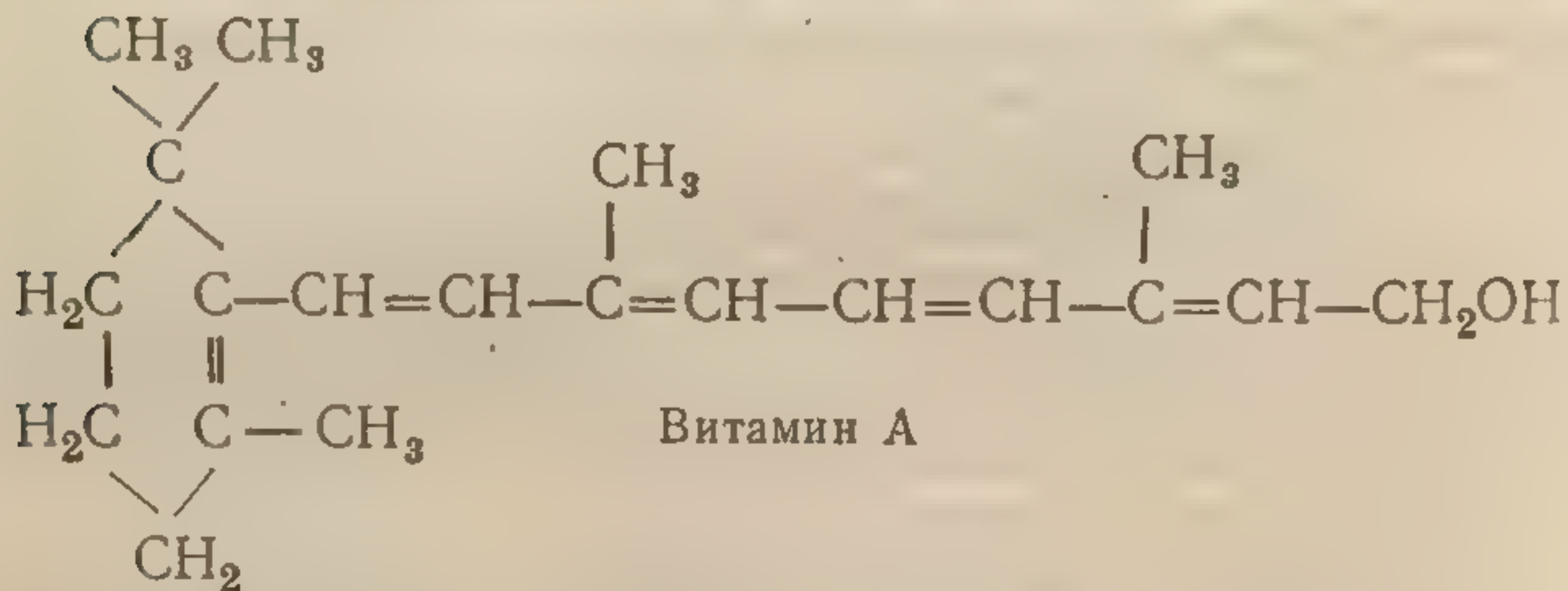
зывает ряд заболеваний, связанных с нарушением обмена веществ (диабет, гигантизм, акромегалия, кретинизм и т. п.).

Определение витаминов и гормонов можно производить биологическими методами (испытанием на животных) или химическими (пользуясь характерными реакциями на тот или иной витамин или гормон).

Хотя биологические методы определения витаминов и гормонов очень специфичны, но громоздки и требуют продолжительного наблюдения над животными. Мы ограничимся поэтому приведением химических способов определения витамина А и каротина, разделения каротиноидов, определения витамина В₁, никотиновой кислоты, витамина С и адреналина.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ВИТАМИН А

Витамин А относится к жирорастворимым витаминам.



Наличие в молекуле витамина А большого количества сопряженных двойных связей обуславливает его легкую окисляемость и способность присоединять водород, галогены и другие вещества. Благодаря наличию спиртовой группы витамин А может образовывать сложные эфиры с жирными кислотами.

В организме витамин А может образовываться из каротина (см. стр. 90).

Первым признаком гиповитаминоза А является ослабление сумеречного зрения (куриная слепота, гемералопия). Далее, при развитии авитаминоза А замедляется или прекращается рост организма и развивается заболевание глаз — ксерофтальмия, понижается также сопротивляемость организма, в особенности дыха-

тельных путей к инфекциям, изменяется нормальное состояние эпителиальной ткани.

Наиболее распространенная качественная реакция на витамин А состоит в том, что витамин А, растворенный в хлороформе, дает синюю окраску с насыщенным хлороформным раствором треххлористой сурьмы.

Эту реакцию, однако, дает не только витамин А, но и ряд каротиноидов, включая даже продукты окисления каротина, не обладающие способностью превращаться в витамин А, хотя интенсивность окраски при этом бывает много слабее, чем с равным количеством витамина А. Поэтому при наличии в исследуемом объекте вместе с витамином А также каротина и некоторых других каротиноидов приходится отделять от витамина А с помощью различных приемов, например, хроматографической адсорбции (см. стр. 93).

Нужно также учитывать, что в некоторых жирах встречаются вещества, которые мешают получению положительной реакции при несомненном присутствии витамина А. В этом случае доказать наличие витамина А в исследуемом объекте можно, предварительно омылив жир, удалив вещества, подавляющие развитие окраски, и только после этого проделав реакцию на витамин А.

Приборы. 1. Штатив с пробирками.
2. Пипетка.

Реактивы. 1. Рыбий жир.
2. Треххлористая сурьма, насыщенный раствор в хлороформе (приготовление см. стр. 332, п. 56).
3. Уксусный ангидрид.

Ход работы

1. Наливают в чистую сухую пробирку 1—2 капли рыбьего жира.

2. Добавляют 5—6 капель хлороформного раствора треххлористой сурьмы и перемешивают. Наблюдают синее окрашивание, которое развивается в случае наличия в жире витамина А.

Следует указать, что выполнение этой реакции требует особой тщательности, так как присутствие влаги даже в ничтожных количествах приводит к образованию из треххлористой сурьмы хлорокиси сурьмы, которая не вступает

в реакцию с витамином А и вызывает помутнение. В целях связывания ничтожного количества воды, которое может содержаться в реагирующем растворе, рекомендуется добавлять к последнему 1—2 капли уксусного ангидрида.

* КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А

Количество витамина А чаще всего определяют методом, основанным на измерении интенсивности окраски, получаемой при вышеописанной цветной реакции с треххлористой сурьмой. Для измерения интенсивности этой окраски существует специальный прибор — т и н т о м е т р, имеющий набор стекол, с помощью которых и производят сравнительную оценку интенсивности окраски, выражая ее в так называемых «с и н и х е д и н и ц а х». В случае отсутствия тинтометра можно для определения интенсивности окраски пользоваться специально приготовленными стандартными растворами сернокислой меди и азотнокислого кобальта.

Ниже приводится методика количественного определения витамина А по способу, предложенному Московской государственной контрольной витаминной станцией.

Наиболее богатым источником витамина А, часто применяемым на практике, является «рыбий жир» (жир печени трески и других рыб, см. табл. 1). Поэтому определение содержания витамина А в «рыбьих жирах» производится особенно часто.

Т а б л и ц а 1

Содержание витамина А в жире
печени некоторых рыб

Жир печени рыб	Содержание витамина А в мг%
Треска	6,25— 27,5
Севрюга	100—137
Щука	375
Морской окунь	До 37 500

Иногда содержание витамина А выражают в условных международных единицах. Одна международная единица соответствует 0,3 μ г витамина А. Количество синих единиц при пересчете на миллиграмм-проценты или на международные единицы умножают на эмпирически найденные коэффициенты.

Прибо



Рис. 3. Пр

- Приборы.
1. Пробирки-эталон, содержащие окрашенные стандартные растворы (приготовление см. стр. 328, п. 34).
 2. Пробирки диаметром в 1 см.
 3. Стекланные палочки.
 4. Бюретка на 10—15 мл с притертым краном (для отмеривания треххлористой сурьмы).
 5. Пипетка на 0,2 мл или на 1 мл с делениями (для отмеривания испытуемого раствора).
 6. Коническая колба с корковой пробкой, в которую вставляется в качестве холодильника длинная стеклнная трубка.
 7. Делительная воронка.
 8. Водяная баня.
 9. Прибор для отгонки эфира в токе сухого углекислого газа (рис. 3).

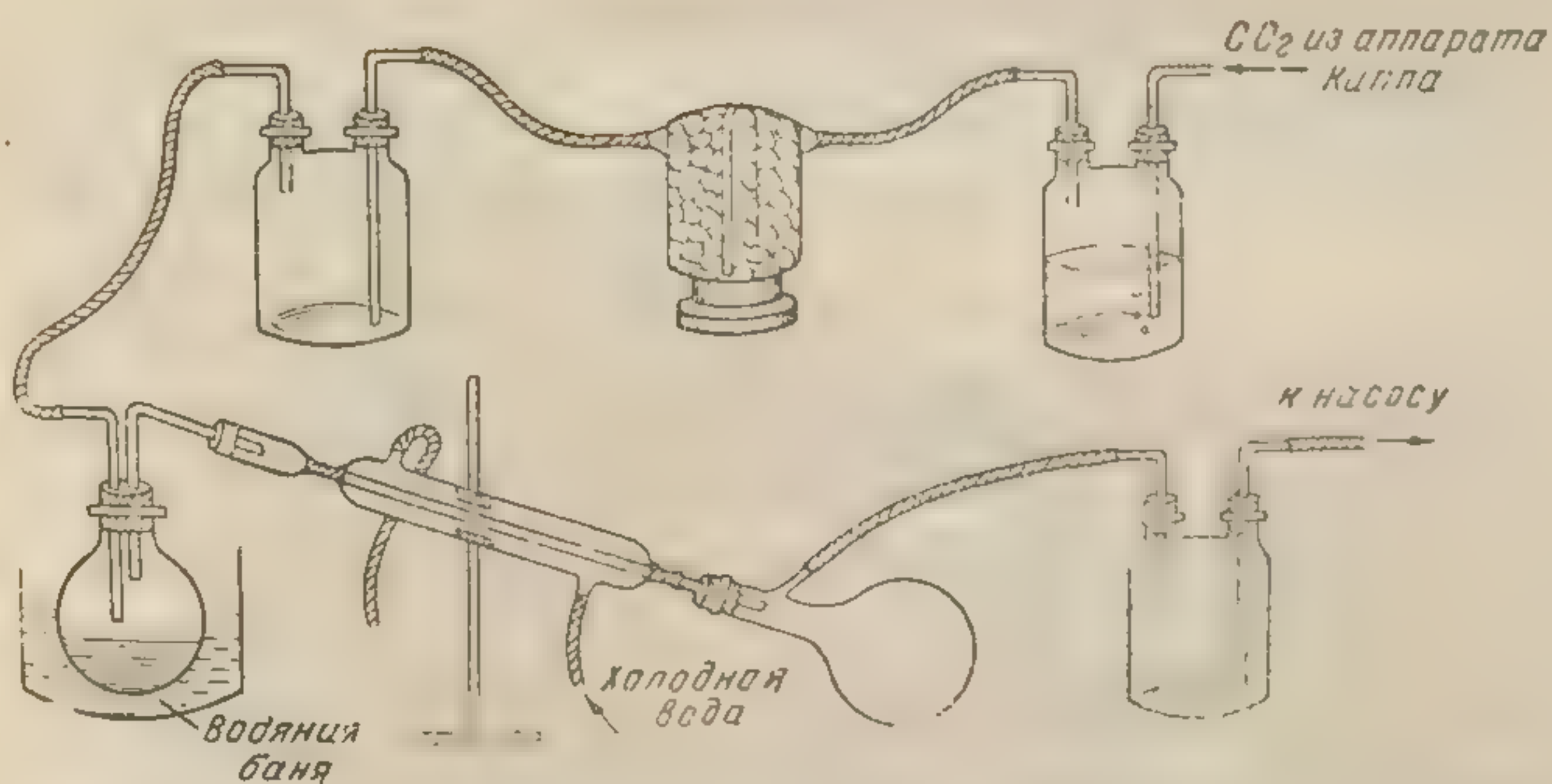


Рис. 3. Прибор для отгонки эфира в токе сухого углекислого газа.

Прибор состоит из следующих частей: аппарата Киппа для получения CO_2 ; трех склянок (для промывания CO_2 водой, его сушки хлористым кальцием и предохранительной склянки); отгоночной колбочки, соединенной с предохранительной склянкой (стеклнная трубка с втекающим газом должна довольно глубоко входить в отгоночную колбочку) и с холодильником; приемной колбы, соединенной трубкой с другой предохранительной склянкой,

которая в свою очередь присоединяется к водоструйному насосу. Прибор должен быть собран с большой тщательностью.

10. Мерный цилиндр или мерная колба на 10—25 мл с пришлифованной пробкой.

- Р е а к т и в ы.**
1. Едкое кали, 0,5 н. раствор в спирте.
 2. Диэтиловый эфир, свободный от перекиси, дважды перегнанный.
 3. Едкое кали, 0,5 н. водный раствор.
 4. Этиловый спирт абсолютный (приготовление см. стр. 321, п. 1).
 5. Хлороформ, очищенный (приготовление см. стр. 334, п. 66).
 6. Треххлористая сурьма, насыщенный раствор в хлороформе (приготовление см. стр. 332, п. 56).
 7. Рыбий жир.

Х о д р а б о т ы ¹

1. Точно отвешивают в коническую колбу 0,2—1 г рыбьего жира. Величина навески зависит от содержания витамина А.

2. Приливают к отвешенной навеске жира 10 мл 0,5 н. спиртового раствора едкого кали, закрывают колбу корковой пробкой со вставленной в нее в качестве холодильника трубкой и омыляют полученный раствор на водяной бане (80—85°) в продолжение 10 минут при постоянном осторожном взбалтывании.

3. По окончании омыления разбавляют содержимое колбы 20 мл дистиллированной воды и охлаждают до комнатной температуры.

4. Экстрагируют (в делительной воронке) неомыляемую фракцию эфиром (свободным от перекисей) дважды: первый раз 50 мл и второй раз 25 мл эфира.

5. Промывают в делительной воронке соединенные эфирные вытяжки первый раз 15 мл дистиллированной воды,

¹ Учитывая сложность необходимого оборудования и реактивов, можно рекомендовать подготовку раствора, омыление и т. п. (пп. 1—7) делать в одной пробе на группу студентов. Из полученного хлороформного раствора витамина А каждый студент может отмерить по 0,2 мл и проделать самостоятельно остальную часть работы (пп. 8—11).

затем 10 мл 0,5 н. водного раствора едкого кали, после чего — вновь два раза водой по 20 мл.

6. Отгоняют эфир в токе сухого углекислого газа. К остатку в колбочке прибавляют 10—20 капель абсолютного спирта (для удаления следов воды). Спирт также удаляют в токе сухого углекислого газа. Температура водяной бани должна быть не выше 80°.

7. Сухой остаток растворяют в очищенном хлороформе, количественно переносят в мерную колбочку на 10—25 мл (в зависимости от количества витамина А в растворе), доводят до метки и тщательно перемешивают.

8. Отмеривают в сухую пробирку (высота 6 см, диаметр 1 см) 0,2 мл исследуемого раствора витамина А в хлороформе.

9. Добавляют 2 мл раствора треххлористой сурьмы, быстро перемешивают стеклянной палочкой и тотчас же сравнивают окраску с рядом эталонов, помня, что синяя окраска раствора достигает максимума через 10—30 секунд.

10. Считают определение законченным, когда найдена одинаковая окраска испытуемой пробирки с одной из пробирок-эталонов. Количество витамина А в испытуемом растворе будет соответствовать тому числу «синих единиц», которое имеет пробирка-эталон, ближе всех подошедшая по окраске к пробирке с испытуемым раствором. В случае, если интенсивность окраски исследуемой жидкости является промежуточной между двумя соседними пробирками-эталонами, берут среднее из значений «синих единиц» этих эталонов.

Необходимо иметь в виду, что таким образом получают хотя и ориентировочные данные, но удовлетворяющие практическим целям.

Для получения более точных результатов рекомендуется подбирать анализируемые количества таким образом, чтобы вести определение с эталонами от четырех до шести «синих единиц», так как в этих пределах достигаются лучшие результаты.

11. Вычисляют содержание витамина А в рыбьем жире по формуле:

$$x = \frac{c \cdot v}{a \cdot 4},$$

где x — содержание витамина А в исследуемом образце в миллиграмм-процентах; c — число синих единиц, найденное при колориметрировании; v — объем хлороформ-

Она была
мне, сестре
целительно ма-
гическим
богатым им
меченая.
Под ког

В связи
тах и в тка
шой интер
вами каре
спирта, а
тенсивност
количеств

Методом
воротке к
тин боли
тинндам
держание
ского, од
каротина
помощи
В но
тина ко
травояд
обычно
Метод
форме.

Π ρ

Ρ ε α

воротке к
тии боль
тинодам
держание
ского, о
каротина
помощи
В но
тина ко
травояд
обычно
Мето
форме.

Π ρ

Ρ ε α

Особенно много каротина содержится в моркови, шпинате, салате, абрикосах. Животные ткани содержат значительно меньше каротина. Из тканей животных наиболее богаты им кора надпочечников, желтое тело яичника, семенники.

При попадании каротина в организм человека гидролитическое расщепление его происходит под действием фермента каротиназы. Таким образом, каротин может заменять витамин А в питании.

В связи с этим определение каротина в пищевых продуктах и в тканях и жидкостях организма представляет большой интерес. Метод определения основан на экстрагировании каротина спиртом и петролейным эфиром. По удалении спирта, а затем петролейного эфира определяется интенсивность окраски остатка, которая пропорциональна количеству каротина.

Методом Рачевского обычно определяют каротин в сыворотке крови. В растительных пищевых продуктах каротин большей частью содержится наряду с другими каротиноидами, поэтому непосредственно определить его содержание описанным методом невозможно. Метод Рачевского, однако, с успехом применяется для определения каротина, после отделения других каротиноидов при помощи хроматографической адсорбции (см. стр. 93).

В норме в сыворотке крови человека содержание каротина колеблется от 0,01 до 0,06 мг%. Сыворотка крови травоядных животных значительно богаче каротином и обычно содержит другие каротиноиды.

Метод Рачевского нами будет описан в упрощенной форме.

- П р и б о р ы.
1. Микропипетка на 0,1 мл.
 2. Пипетка на 2 мл.
 3. Стеклянная палочка.
 4. Толстостенная пробирка.
 5. Градуированная пипетка на 1 мл с надетой на нее каучуковой трубкой.
 6. Фарфоровая чашечка.
 7. Электрическая плитка.

- Р е а к т и в ы.
1. Этиловый спирт.
 2. Петролейный эфир (температура кипения 30—50°).
 3. Сыворотка крови

Ход работы

1. В сухую толстостенную пробирку отмеривают 0,1 мл сыворотки крови и 2 мл спирта.

2. Перемешивают стеклянной палочкой содержимое пробирки в продолжение 2 минут.

3. Приливают 2 мл петролейного эфира, закрывают пробирку пробкой и слегка перемешивают содержимое пробирки, придерживая пробку.

4. Прибавляют в пробирку по каплям 2 мл дистиллированной воды и оставляют пробирку стоять на 5 минут.

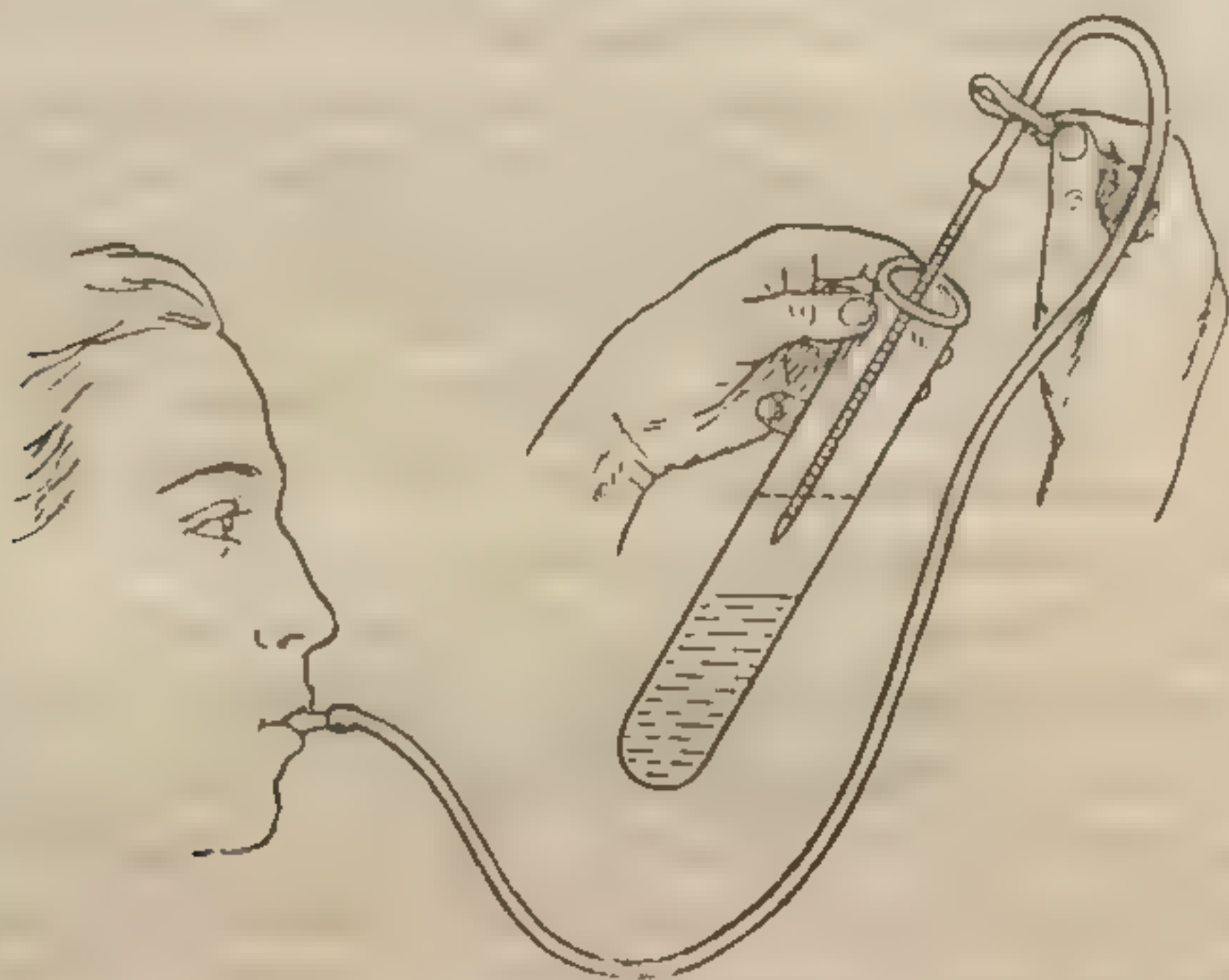


Рис. 4. Отсасывание эфирного раствора каротина.

5. Осторожно отсасывают (рис. 4) с помощью градуированной пипетки 1 мл жидкости из верхнего слоя (эфирный раствор) и выпускают ее по каплям (пользуясь зажимом) на дно чистой и сухой фарфоровой чашечки, нагретой до 40° . Выпускание эфирного раствора по каплям дает возможность испариться каждой предыдущей капле.

6. Прекращают выпускание эфирного раствора, как только на дне фарфоровой чашечки появится отчетливое желтое колечко, что соответствует, по Рачевскому, около 0,05 μ г каротина.

7. Производят отсчет миллилитров эфирного раствора, прилитого на дно фарфоровой чашечки, и делают соответствующие вычисления для определения количества каротина в сыворотке крови. Эти вычисления будут ясны из следующего примера,

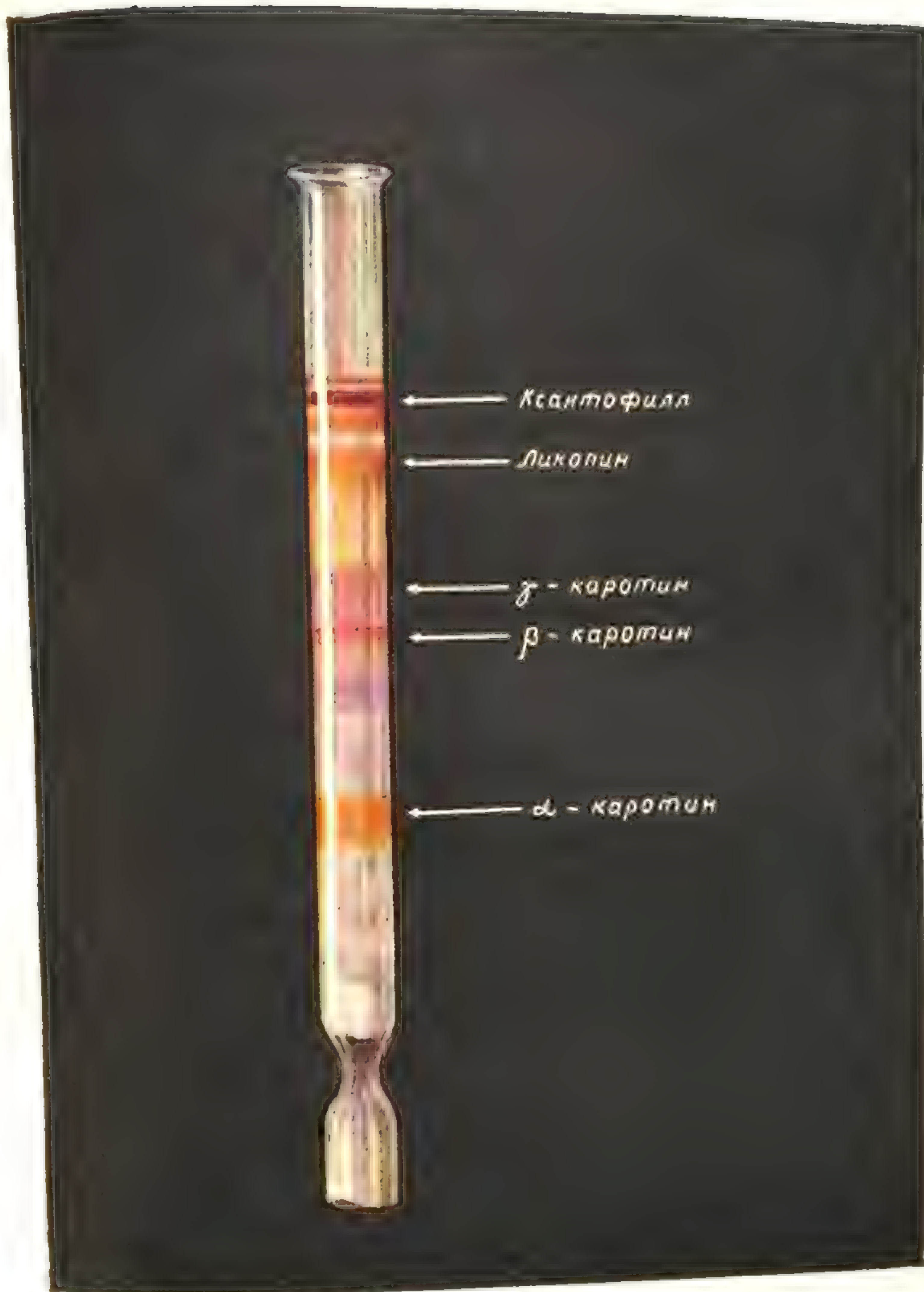


Рис. 5. Разделение каротиноидов красного перца на колонке.

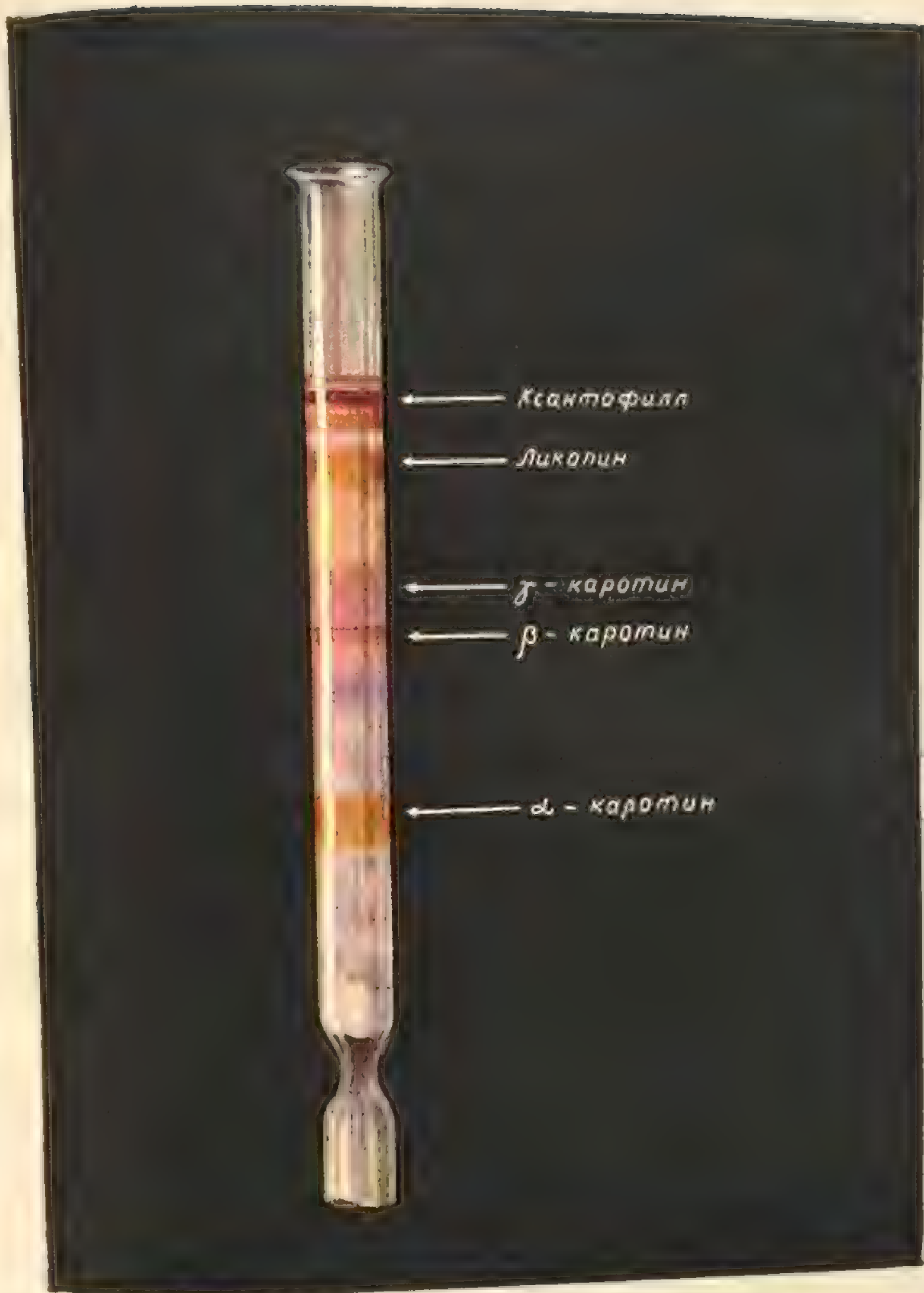


Рис. 5. Разделение каротиноидов красного перца на колонке.

... = 250 ...
...
... сыеретки, взято
... эфирного р

РАЗДЕЛЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕ

Жирорастворимые
строению к каротину
или липохром
окраска моркови (гла
главным образом ли
перца и многих дру

Способностью об
обладают только соб
с этим бывает важн
венное содержание
и другие каротино

Для целей раз
метод хромато
том. Принцип хр
адсорбции
мике; например,
материала через

В настоящее
ных вариантах н
исследовательск
(см. стр. 177).

Для хромато
кают из исслед
ным эфиром и п
алюминия, кал
При этом пигме
лосы, в зави
на данном адс

Если колон
то полосы пигм
творит

Допустим, эфирного раствора прилито на дно фарфоровой чашечки 0,4 мл, тогда в 100 мл сыворотки каротина

будет $\frac{0,05 \cdot 2 \cdot 100}{0,4 \cdot 0,1} = 250 \text{ } \mu\text{г}$, где 0,1 — количество милли-

литров сыворотки, взятое для анализа, а 2 — количество миллилитров эфирного раствора каротина.

РАЗДЕЛЕНИЕ КАРОТИНОИДОВ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ АДСОРБЦИИ ПО ЦВЕТУ

Жирорастворимые пигменты, близкие по химическому строению к каротину, называют каротиноидами или липохромами. От каротиноидов зависит окраска моркови (главным образом β -каротин), помидоров (главным образом ликопин), плодов шиповника, красного перца и многих других плодов, овощей и ягод.

Способностью образовывать витамин А в организме обладают только собственно каротины (см. стр. 90). В связи с этим бывает важно определить качественное и количественное содержание каротина в продуктах, содержащих и другие каротиноиды.

Для целей разделения каротиноидов наиболее удобен метод хроматографии, разработанный М. С. Цветом. Принцип хроматографии заключается в применении адсорбции (или другого метода разделения) в динамике; например, путем пропускания раствора исследуемого материала через колонку адсорбента.

В настоящее время хроматографическая методика в разных вариантах находит очень широкое применение в научно-исследовательской работе и аналитической практике (см. стр. 177).

Для хроматографического анализа каротиноиды извлекают из исследуемого материала бензином или петролейным эфиром и пропускают через колонку адсорбента (окись алюминия, кальция или магния, углекислый кальций и др.). При этом пигменты разделяются на окрашенные полосы, в зависимости от их способности адсорбироваться на данном адсорбенте (рис. 5).

Если колонку затем промывать чистым растворителем, то полосы пигментов сдвигаются вниз по ходу течения растворителя и поочередно вымываются из колонки. Так как

каротины располагаются в колонке ниже других каротиноидов, то их легко собрать при промывании колонки растворителем и определить количественно колориметрически.

Способы количественного определения каротина с помощью хроматографии по М. С. Цвету разработаны Государственной контрольной витаминной станцией. Эти способы, однако, трудно использовать в студенческом практикуме, так как они требуют много времени и реактивов. Мы ограничимся поэтому описанием качественного разделения каротиноидов на хроматографической колонке.

- П р и б о р ы.
1. Ступка с пестиком.
 2. Воронка с сухим фильтром.
 3. Прибор для хроматографии (рис. 6).
 4. Водоструйный насос.
 5. Химический стаканчик.
 6. Цилиндрик градуированный.
 7. Вата.

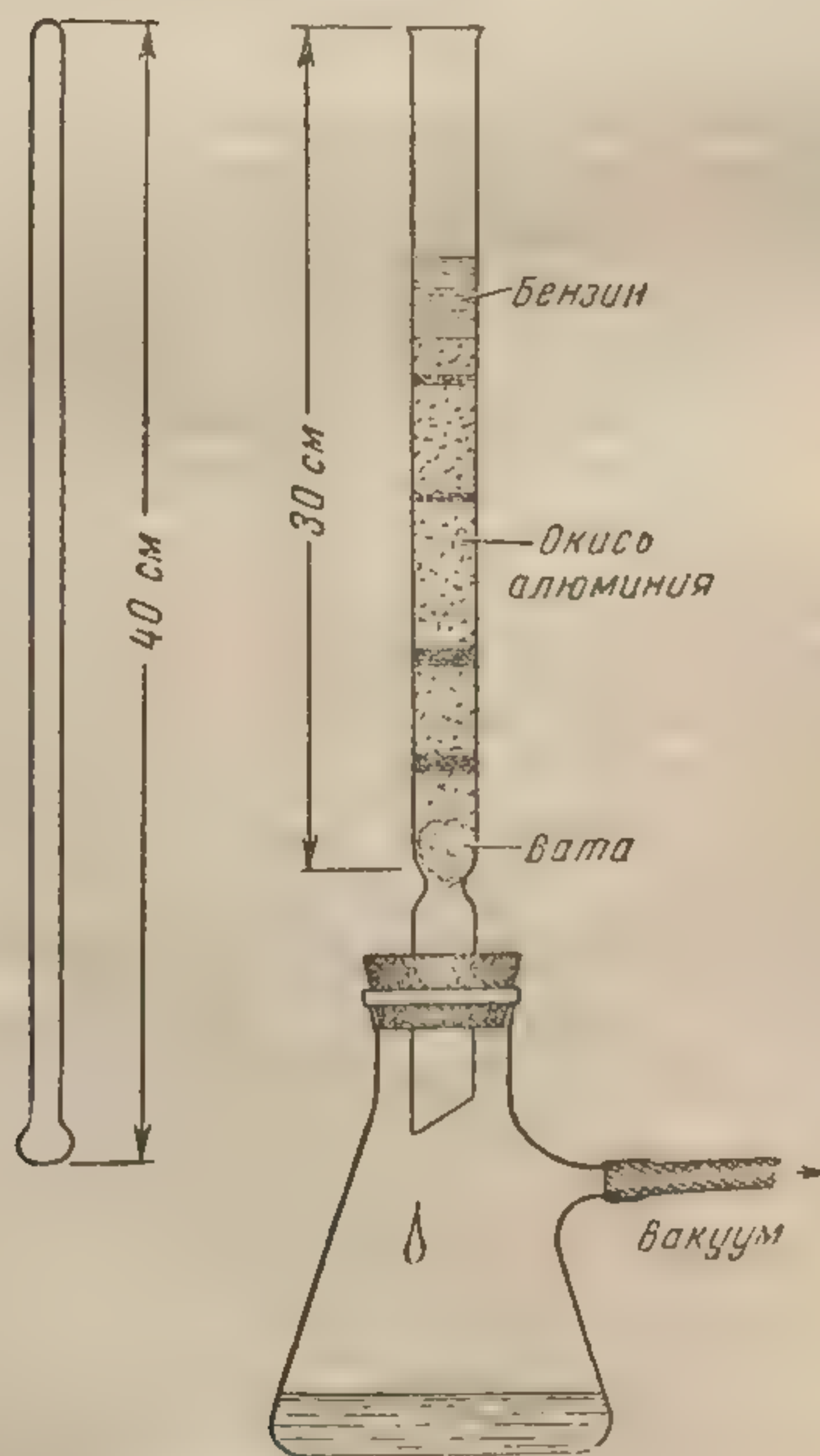


Рис. 6. Прибор М. С. Цвета для хроматографии.

1. Растир
с 10 мл бенз
зновую выт
в стаканчик
2. Запол
в место суж
сочек ваты
всыпают о
каждый р

3. Нали
колбу для
сосу и пу
чтобы бенз
алюминия)
пугу.

4. Ког
окиси ал
каротино
ника), н
Вверх
идут пол
тина (рис

5. Сле
покрыта
пузырьки
20—30 м
колонке.

В и т
а не в р
витамина
сложное
и т и а з

р е а к т и в ы. 1. Бензин, сухой (температура кипения 70—80°).

2. Красный перец, сухой (можно заменить сухой морковью или шиповником).

3. Окись алюминия, прокаленная (приготовление см. стр. 327, п. 28).

Х о д р а б о т ы

1. Растирают в ступке около 1 г сухого красного перца с 10 мл бензина. При этом каротиноиды переходят в бензиновую вытяжку. Полученную вытяжку отфильтровывают в стаканчик через сухой фильтр.

2. Заполняют колонку для хроматографии. Для этого в место сужения колонки вводят стеклянной палочкой кусочек ваты толщиной около 1 см. Затем мелкими порциями всыпают около 7 г окиси алюминия и утрамбовывают ее каждый раз стеклянной палочкой.

3. Наливают в колонку 5—7 мл бензина. Присоединяют колбу для отсасывания (от прибора) к водоструйному насосу и пускают насос, отрегулировав его таким образом, чтобы бензин равномерно пропитал весь адсорбент (окись алюминия) и из колонки вытекало бы 25—30 капель в минуту.

4. Когда уровень растворителя подойдет к поверхности окиси алюминия, в колонку наливают 2—3 мл экстракта каротиноидов из перца (или 5—6 мл из моркови или шиповника), не меняя скорости отсасывания.

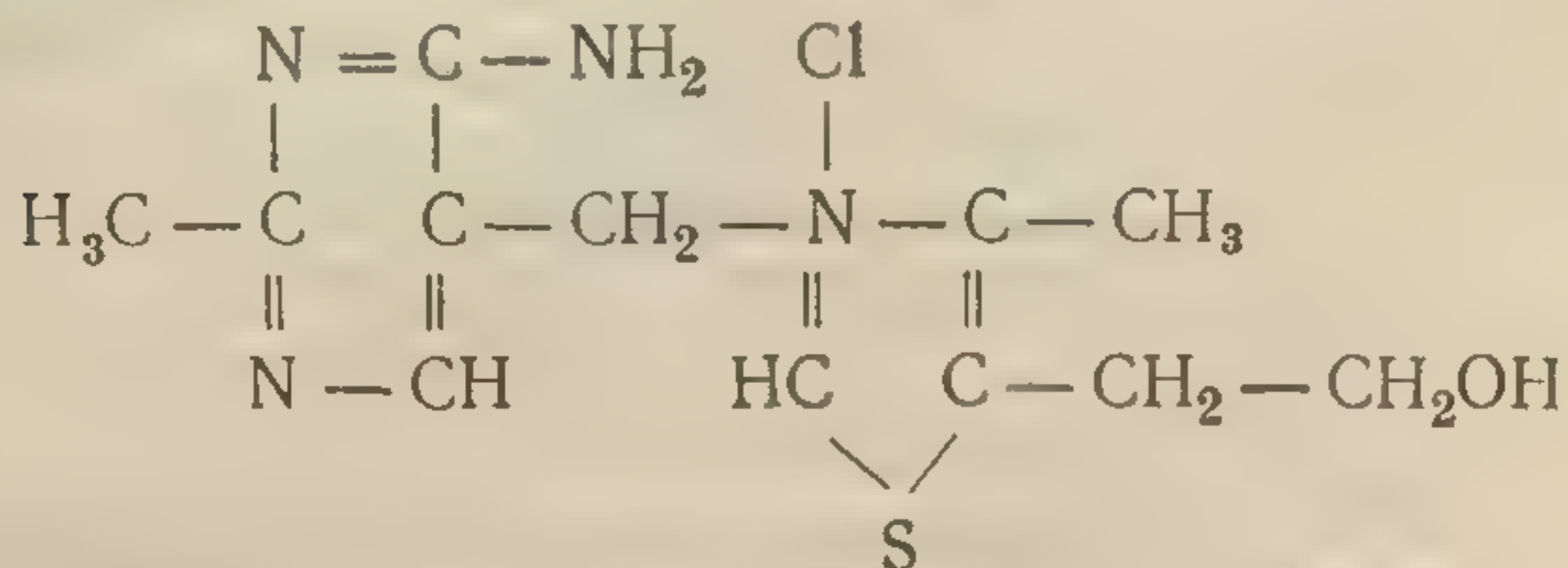
Вверху колонки задерживаются ксантофиллы, затем идут полосы ликопина, γ-каротина, β-каротина и α-каротина (рис. 5).

5. Следя за тем, чтобы колонка адсорбента была все время покрыта жидкостью и в адсорбирующую массу не попадали пузырьки воздуха, прибавляют небольшими порциями 20—30 мл бензина и следят за передвижением полос в колонке.

РЕАКЦИЯ НА ВИТАМИН В₁ (ТИАМИН)

В и т а м и н В₁, называемый также т и а м и н о м или а н е в р и н о м, относится к водорастворимым витаминам группы В. Химически он представляет собой сложное соединение, содержащее п и р и м и д и н о в о е и т и а з о л о в о е кольца. Тиамин, дважды фосфорили-

рованный по спиртовой гидроксильной группе, выполняет функции коферментов декарбоксилазы и дегидразы пировиноградной кислоты.



Тиамин (витамин В₁)

Недостаток витамина В₁ прежде всего выражается в поражении периферической нервной системы—множественном полиневрите, известном под названием «бери-бери».

Тиамин образует соединение розового цвета с диазофенилсульфоновой кислотой (диазореактив) и, при отсутствии других веществ, дающих окраску с этим реактивом, может быть обнаружен химически.

П р и б о р ы. Штатив с пробирками.

Р е а к т и в ы. 1. Щелочной раствор (приготовление см. стр. 334, п. 67).

2. Диазореактив (приготовление см. стр. 323, п. 14).

3. Тиамин, 0,01% раствор, подкисленный соляной кислотой до pH = 3—4.

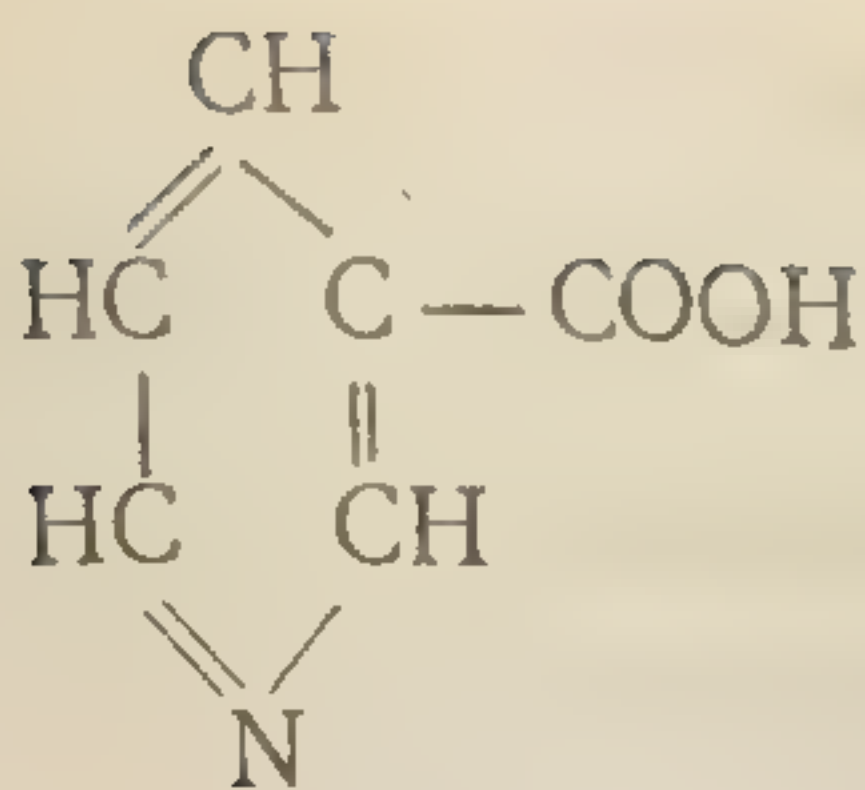
Х о д р а б о т ы

1. Наливают в пробирку около 1 мл щелочного раствора и добавляют к нему 10—12 капель (0,5—0,6 мл) диазореактива.

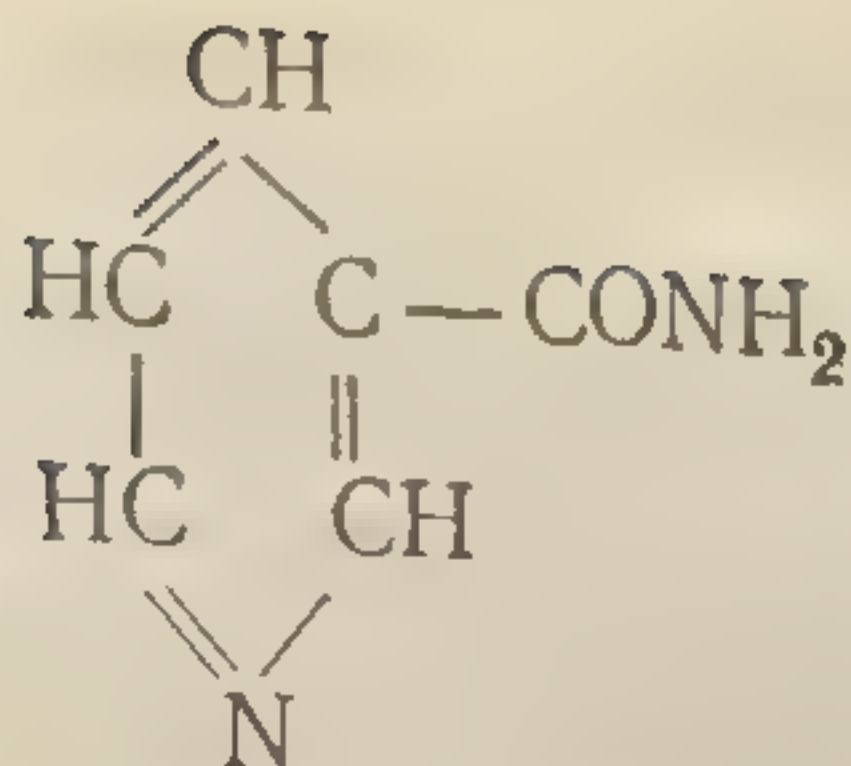
2. Через минуту добавляют 2—4 капли раствора тиамина; желтая окраска, переходящая через 2—3 минуты в розовую, указывает на присутствие витамина В₁.

РЕАКЦИЯ НА НИКОТИНОВУЮ КИСЛОТУ И ЕЕ АМИД

Никотиновая кислота и ее амид представляют собой водорастворимый витамин комплекса В. Отсутствие или недостаток никотиновой кислоты или ее амида в пище приводит к характерному авитаминозу — пеллагре,



Никотиновая
кислота



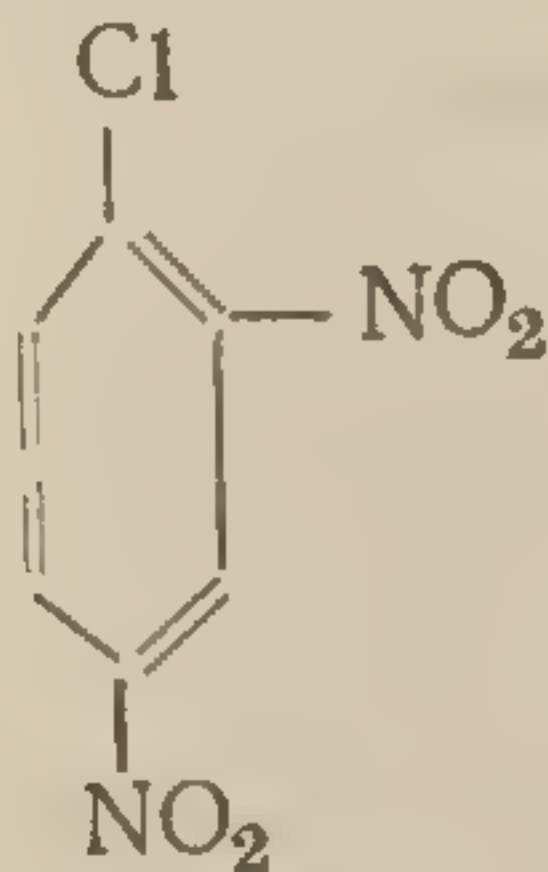
Амид никотиновой
кислоты

выражающейся в поражении нервной системы, желудочно-кишечного тракта и кожи.

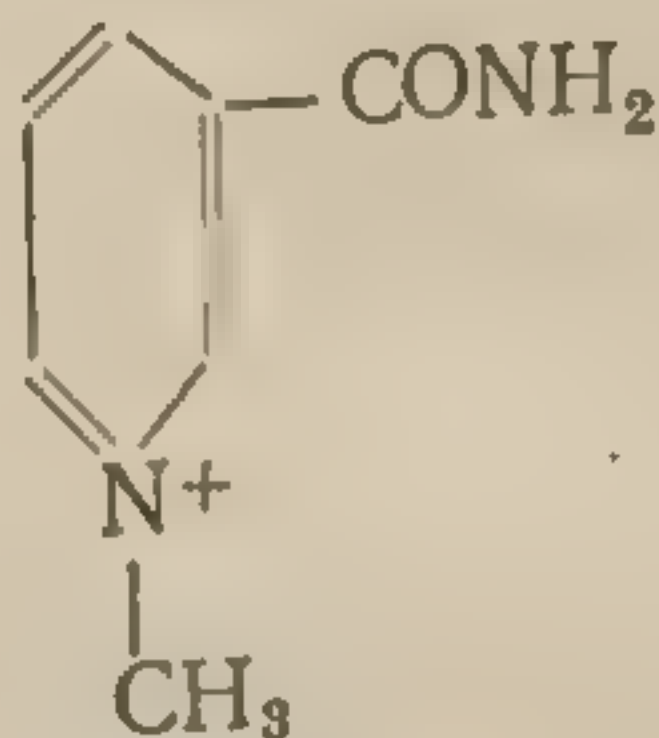
Противопеллагрический витамин (никотиновую кислоту и ее амид) называют также в и т а м и н о м РР. В организме амид никотиновой кислоты является с о с т а в н о й частью кодегидраз, т. е. входит в состав небелкового компонента ферментов, осуществляющих окисление за счет отнятия водорода.

Никотиновая кислота дает розово-фиолетовую окраску с 2,4-динитрохлорбензолом. Амид никотиновой кислоты образует с тем же реактивом соединение красного цвета.

Нормальная моча содержит производные никотиновой кислоты, главным образом в виде N-метилникотинамида, который может быть открыт в моче упомянутым реактивом после удаления окрашенных веществ, мешающих реакции. Отсутствие этой реакции в моче указывает на авитаминоз РР.



2,4-Динитрохлор-
бензол



N-Метилникотин-
амид

П р и б о р ы.

1. Штатив с пробирками.
2. Водяная баня.
3. Воронка с фильтром.
4. Пипетка на 10 мл с делениями.

5. Фарфоровая чашка.
6. Стеклянная палочка.
7. Пипетка с грушей или маленький цилиндр.

Р е а к т и в ы. 1. Древесный уголь.
2. 2,4-Динитрохлорбензол, 1% раствор в спирте.
3. Едкий натр, 0,1% раствор в спирте.
4. Никотиновая кислота, 0,1% раствор.

Х о д р а б о т ы

I. Реакция на никотиновую кислоту

1. Наливают около 1 мл раствора никотиновой кислоты в фарфоровую чашку и упаривают досуха на водяной бане.

2. При помощи пипетки с грушей или маленького цилиндра добавляют около 1 мл спиртового раствора 2-4-динитрохлорбензола (ядовит!) к сухому остатку и тщательно перемешивают содержимое стеклянной палочкой.

3. Снова упаривают досуха на водяной бане и продолжают нагревание сухого остатка в течение 10—15 минут.

4. Дают фарфоровой чашке остыть до комнатной температуры и добавляют около 3 мл спиртового раствора щелочи. Отмечают розово-фиолетовый цвет жидкости.

II. Открытие амида никотиновой кислоты в моче

1. Наливают около 5 мл мочи в пробирку, добавляют щепотку древесного угля и встряхивают 3—4 минуты. Моча при этом обесцвечивается вследствие адсорбции на угле пигментов мочи. Никотиновая кислота, ее амид и другие производные остаются в растворе.

2. Отфильтровывают около 3 мл обесцвеченной мочи в фарфоровую чашку и упаривают фильтрат досуха на водяной бане.

3. Поступают далее так же, как и с раствором никотиновой кислоты, начиная с пункта 2. Наблюдают красное окрашивание от амида никотиновой кислоты.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА С

В и т а м и н С (а с к о р б и н о в а я к и с л о т а) является одним из важнейших факторов питания. Роль его в обмене веществ до сих пор не выяснена полностью, хотя большое значение его для жизненных процессов несомненно. Полагают, что участие аскорбиновой кислоты в биохимиче-

ских реакциях связано с ее окислительно-восстановительными свойствами.

Недостаток или отсутствие витамина С в пище в течение продолжительного времени приводит к тяжелому заболеванию, известному под названием цинги, или скорбута. Явления гиповитаминоза С (утомляемость, небольшие кровоизлияния) наступают при недостатке витамина С довольно скоро.

Аскорбиновая кислота весьма нестойка и легко окисляется на воздухе (этот процесс идет быстрее в щелочной среде и в присутствии следов тяжелых металлов, особенно меди). Поэтому в овощах и фруктах при хранении витамин С постепенно разрушается. Свежие овощи и фрукты вследствие этого всегда богаче витамином С.

Нагревание (при приготовлении пищи) ускоряет окисление (разрушение) витамина С. Следует поэтому избегать продолжительного кипячения пищевых продуктов, содержащих этот витамин.

Содержание витамина С в некоторых пищевых продуктах представлено в табл. 2.

Таблица 2

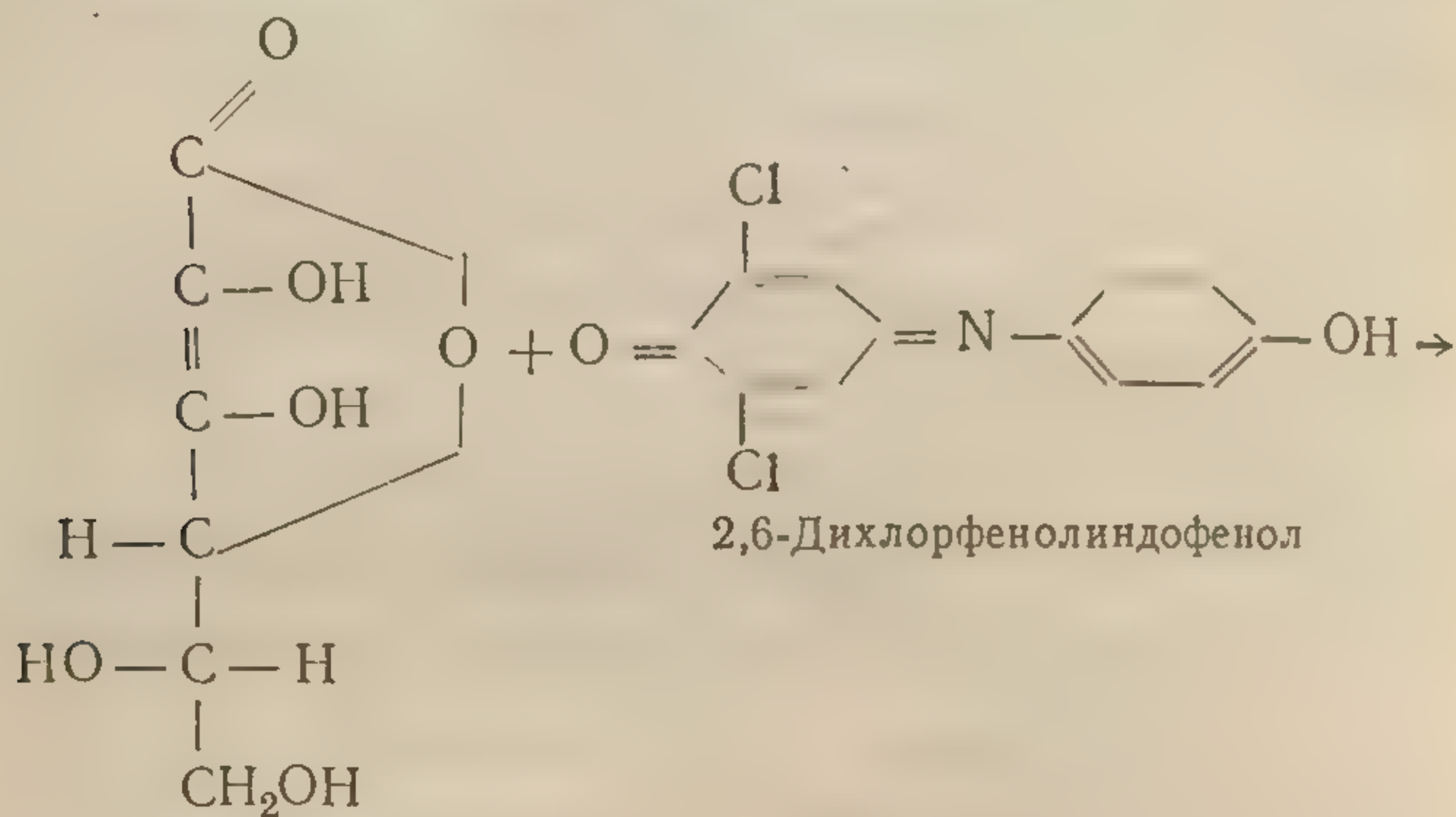
Содержание витамина С в некоторых продуктах

Наименование продуктов	Количество аскорбиновой кислоты в мг на 100 г сырого продукта
Шиповник, сухой очищенный, разные виды . . .	от 120 до 25 000 ¹
Смородина черная	100—400
Хвоя ели, сосны	150—250
Надпочечники быка (кора)	150—190
Петрушка—зелень	100
Лимон	40
Капуста белокачанная	25—66
Молоко кобылье и кумыс	20—30
Картофель	6—17
Молоко женское	3—5

¹ Северные разновидности шиповника богаче витамином С, чем южные. Продажный сушеный шиповник содержит обычно от 1 до 5% аскорбиновой кислоты.

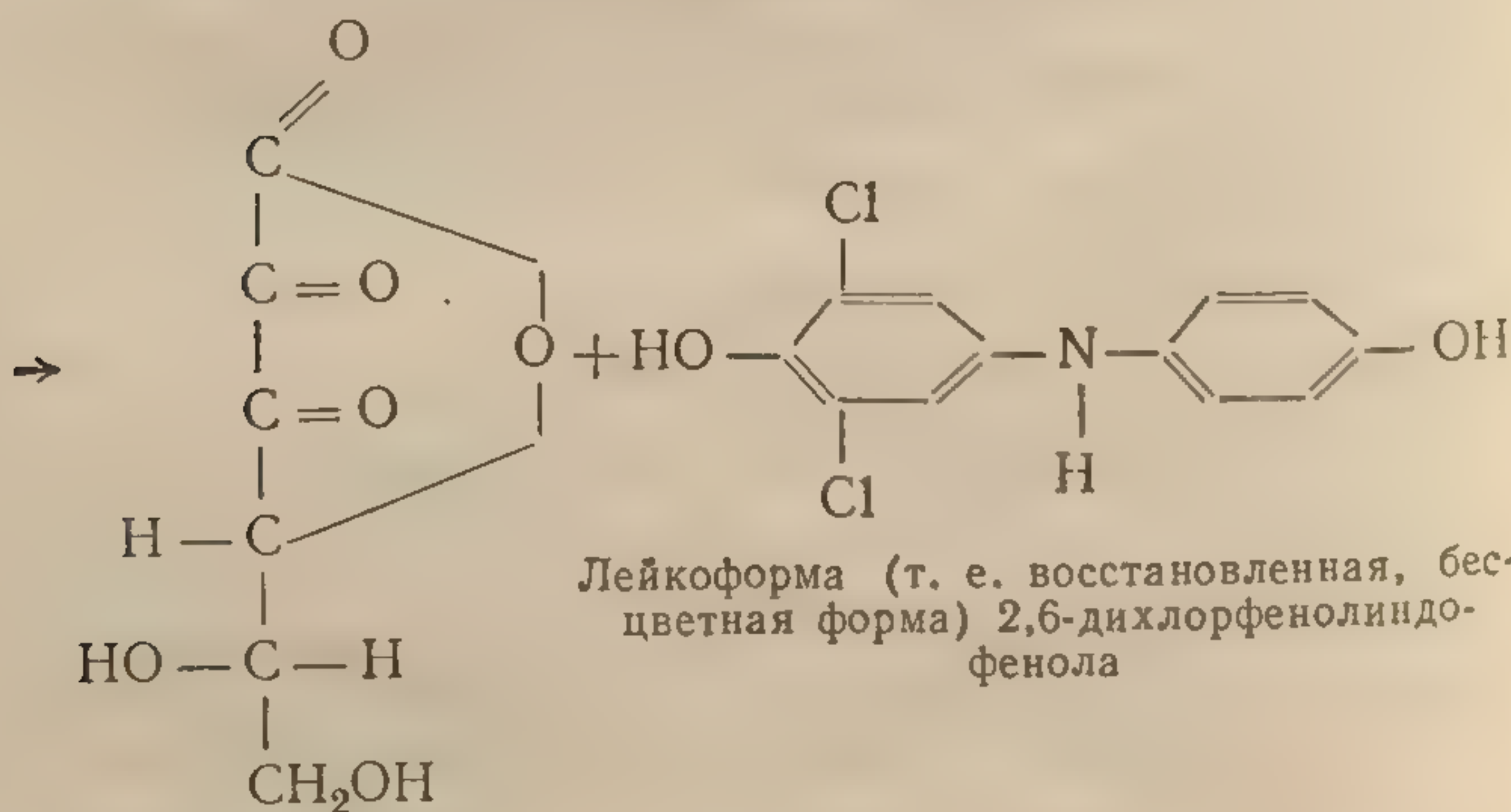
Аскорбиновая кислота может восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол. При этой реакции витамин С переходит в окисленную форму (дегидроаскорбиновую кислоту).

Реакция идет следующим образом:



Аскорбиновая
кислота

2,6-Дихлорфенолиндофенол



Дегидроаскорбино-
вая кислота

Лейкоформа (т. е. восстановленная, бес-
цветная форма) 2,6-дихлорфенолиндо-
фенола

Водный раствор натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола окрашен в синий цвет, благодаря синей окраске аниона дихлорфенолиндофенола;

в кислой среде недиссоциированная молекула дихлорфенолиндофенола имеет розовую окраску, при восстановлении же он обесцвечивается. Окраска зависит от наличия хиноидной структуры, которая переходит в бензольное кольцо при восстановлении (обесцвечивании).

Изменениями окраски этого индикатора и пользуются как для качественной реакции на витамин С, так и для количественного определения его.

Следует, однако, помнить, что реакция с 2,6-дихлорфенолиндофенолом имеет недостатки, которые могут обуславливать целый ряд ошибок. Источниками этих ошибок могут являться:

1. Наличие витамина С не только в восстановленной форме, но и в других формах — дегидроаскорбиновая кислота и связанная аскорбиновая кислота. В этих случаях витамин С не обесцвечивает краски, но биологически активен.

2. Присутствие в исследуемых водных вытяжках различных восстанавливающих веществ (дубильные вещества, цистеин, глутатион и др.), которые также могут реагировать с 2,6-дихлорфенолиндофенолом.

3. Присутствие различных пигментов, затрудняющих наблюдение за изменением окраски.

Ввиду этого был предложен ряд модификаций, которые в значительной мере устраняют указанные недостатки реакции с 2,6-дихлорфенолиндофенолом. Описание этих модификаций, часто сильно усложненных, можно найти в специальной литературе.

I. Качественная реакция на витамин С

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. 1. Соляная кислота, 10% раствор.
2. 2,6-дихлорфенолиндофенол, натриевая соль, 0,001 н. раствор (приготовление см. стр. 324, п. 16).
3. Исследуемый раствор (приготовление см. стр. 102, «Количественное определение витамина С»).

4. Перекись водорода, 3% раствор.

Ход работы

1. Наливают в две пробирки по 2—3 мл исследуемого раствора.

2. В одной из пробирок разрушают витамин С путем добавления нескольких капель перекиси водорода и кипячения.

3. Добавляют в обе пробирки по 1—2 капли раствора соляной кислоты и затем (при легком встряхивании) по каплям раствор натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола. При наличии витамина С раствор обесцвечивается. При дальнейшем прибавлении индикатора раствор окрашивается в розовый цвет, так как вся аскорбиновая кислота в пробе уже окислена и индикатор более не восстанавливается. В пробирке, где витамин С был разрушен, обесцвечивания не происходит и даже от 1—2 капель индикатора появляется розовое окрашивание.

II. Количественное определение витамина С

Количественное определение аскорбиновой кислоты основано на описанной выше реакции с 2,6-дихлорфенолиндофенолом. Пользуясь изменением окраски, по количеству реактива, израсходованного на окисление витамина С, можно определить количество витамина С в исследуемом материале.

Излагаемый ниже упрощенный метод определения витамина С, предложенный Государственной контрольной витаминной станцией, прост и удобен; однако не следует забывать, что реакция с 2,6-дихлорфенолиндофенолом имеет недостатки, которые могут обуславливать ряд ошибок.

П р и б о р ы. 1. Конические колбочки на 50 мл.
2. Фарфоровая ступка с пестиком.
3. Бюретка на 10 или 25 мл.
4. Пипетка на 3 мл.
5. Мерный цилиндр или пипетка на 10 мл с делениями.
6. Воронка с фильтром.

Р е а к т и в ы. 1. Соляная кислота, 2% раствор.
2. 2,6-Дихлорфенолиндофенол, натриевая соль, 0,001 н. раствор (приготовление см. стр. 324, п. 16).
3. Стекло, мелко истолченное.
4. Шиповник или хвоя.

Спутем
и кипя-

- раствора
нии) по
линдофе-
ивается.
ор окра-
овая ки-
е восста-
азрушен,
ль инди-

- C

- слоты ос-
еинолиндо-
оличество
амина С,
следуемом

- ния вита-
льной ви-
ледует за-
лом имеет
д ошибок.
50 мл.
стиком.
мл.

- тка на 10 мт

- раствор.
л, натриевая
приготовле-

11408.

1140E.

1140E.

1140E.

1140E.

1140E.

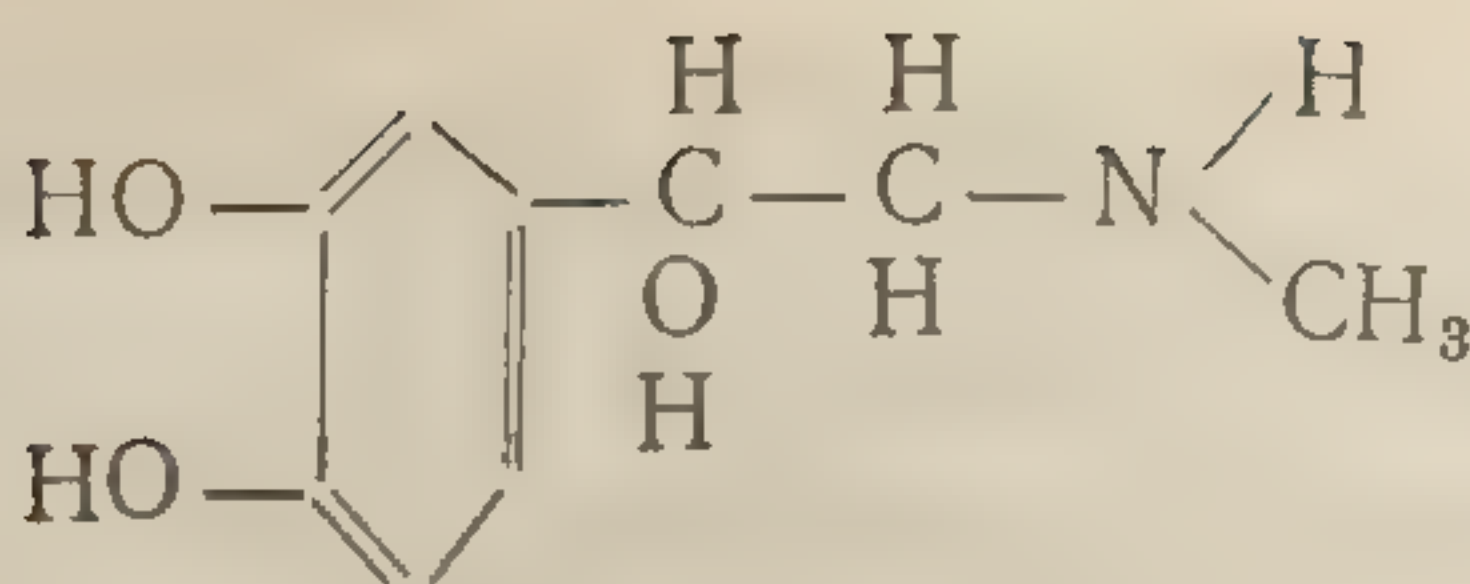
1140E.

1140E.

1140E.

1140E.

1140E.



Адреналин

П р и б о р ы. 1. Фарфоровая чашечка или крышка от тигля.

2. Штатив с пробирками.

Р е а к т и в ы ¹. 1. Нитритно-молибдатный реактив (приготовление см. стр. 327, п. 27).

2. Соляная кислота, 2% раствор.

3. Едкий натр, 4% раствор.

4. Хлорное железо, 3% раствор.

5. Адреналин, 0,025% раствор (1:4 000)

6. Пирокатехин, 0,05% раствор.

Х о д р а б о т ы

I. 1. Помещают каплю раствора адреналина в фарфоровую чашечку, добавляют каплю 2% соляной кислоты, каплю нитритно-молибдатного реактива и перемешивают стеклянной палочкой. Наблюдают желто-оранжевую окраску.

2. Добавляют каплю раствора щелочи; окраска становится малиновокрасной.

3. Прибавляют 2—3 капли раствора соляной кислоты. Окраска переходит в лимонножелтую.

II. 1. В пробирку наливают около 1 мл раствора пирокатехина и добавляют каплю раствора хлорного железа. Появляется характерная зеленая окраска.

2. В другую пробирку наливают около 1 мл раствора адреналина и добавляют каплю раствора хлорного железа. Наблюдается зеленая окраска, вследствие наличия остатка пирокатехина, входящего в молекулу адреналина.

3. Добавляют в обе пробирки по 1—2 капли раствора щелочи. Окраска переходит в виннокрасную.

¹ Реактивы 1, 2, 3, 4 и 5 желательно иметь в капельницах.

ЛИПИДЫ И ИХ ОБМЕН

Понятие «липиды» более широкое, чем жиры, и охватывает, помимо собственно жиров, также и жироподобные вещества, или липоиды: фосфатиды и стериды.

К липоидам обычно относят также свободные стеринны (стеролы) и некоторые другие соединения.

Общим свойством всех липидов является растворимость в жировых растворителях: диэтиловом эфире, хлороформе, бензоле, сероуглероде, петролейном эфире, горячем спирте и др., и нерастворимость в воде.

Липиды широко распространены в живой природе и встречаются практически в каждой клетке. Многие липиды и их производные представляют собой биологически активные вещества.

Собственно жиры играют большую роль в питании (коровье масло, сало, растительные масла и т. п.) благодаря своей высокой калорийности (9000 калорий). Кроме того, отложенные в организме жиры (жировая ткань) являются запасными питательными веществами, а также предохраняют внутренние органы от механических повреждений и организм от охлаждения.

Липоидами особенно богата нервная ткань, половые железы, сперма, кора надпочечников¹.

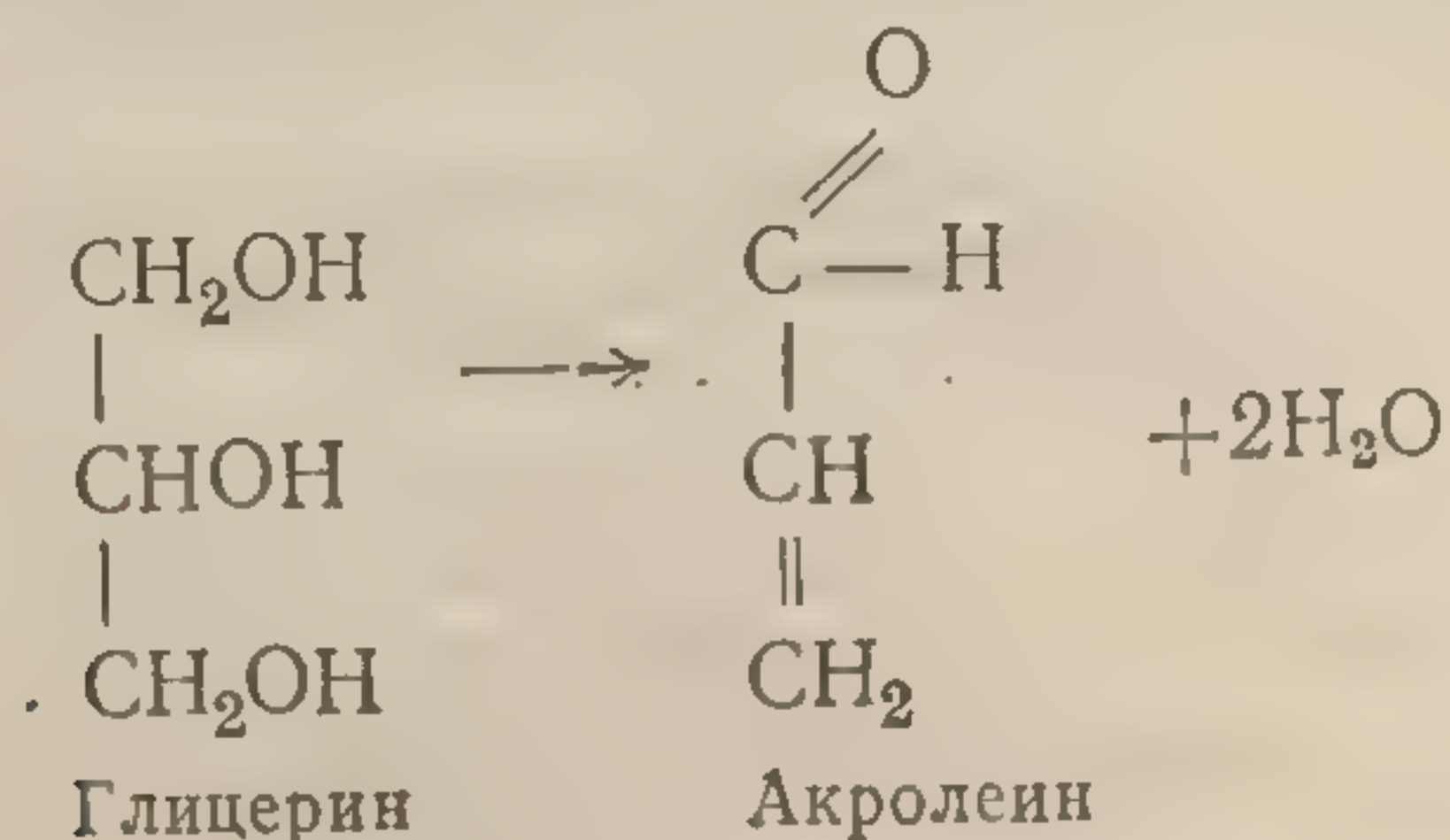
Важную биологическую роль играют стеринны и их производные (половые гормоны, желчные кислоты и т. п.).

ОБНАРУЖЕНИЕ ЖИРОВ

Жиры дают характерное масляное пятно, например, на бумаге.

¹ Изучением обмена липоидов в нервной ткани много занимались А. В. Палладин и Г. Я. Городисская.

Реакцией на присутствие жира может служить так называемая **а к р о л е и н о в а я** п р о б а. Акролеиновой пробой открывается в жирах глицериновый остаток, который при нагревании жира частично переходит в свободный глицерин. Глицерин далее теряет воду и образует ненасыщенный альдегид — **а к р о л е и н**, легко обнаруживаемый по специфическому раздражающему запаху.



Акролеин может образоваться при пережаривании пищи и от его присутствия в значительной мере зависит резкий, удушливый запах кухонного чада. Акролеиновую пробу производят, нагревая жир в присутствии бисульфита калия или натрия (в качестве водоотнимающего средства).

Липиды, не содержащие глицерина (воск, жирные кислоты, стерины и т. п.), акролеиновой реакции не дают.

П р и б о р ы. 1. Штатив с сухими пробирками.

2. Стеклопалочка.

Р е а к т и в ы. 1. Подсолнечное масло или какой-нибудь другой жир.

2. Воск.

3. Кислый сернокислый калий, сухой.

4. Писчая бумага.

Х о д р а б о т ы

I. Проба на образование пятна

Наносят стеклянной палочкой каплю жира на кусок бумаги. Наблюдают появление сального пятна, не исчезающего при нагревании.

II. Акролеиновая проба

1. Помещают в сухую пробирку 1—2 капли жира, добавляют щепотку сухого кислого сернокислого калия и нагревают до появления белых густых паров. Резкий раз-

дражающий запах (осторожно!) говорит об образовании акролеина.

2. Производят ту же реакцию с кусочком воска. Образование акролеина не происходит, так как молекула воска не содержит остатка глицерина.

РАСТВОРЕНИЕ И ЭМУЛЬГИРОВАНИЕ ЖИРОВ

Жиры и другие липиды нерастворимы в воде, но растворяются во многих органических жидкостях. С водой жир может образовать эмульсию, т. е. дисперсную систему из двух несмешивающихся жидкостей. Эмульсия, однако, неустойчива и при стоянии жир вновь всплывает на поверхность, образуя два слоя — жировой и водный. Если же к смеси добавить немного белка или щелочи, мыла, щелочно реагирующих солей (соды), желчи или некоторых других веществ, то при взбалтывании эмульсия становится устойчивой. Стойкость эмульсии зависит от того, что эти вещества понижают поверхностное натяжение между поверхностными слоями жировых шариков и раствором белка или мыла, получающегося при взаимодействии жира со щелочами. Понижение поверхностного натяжения препятствует слипанию жировых капель и благодаря этому удерживает эмульсию в стойком состоянии. Примером такой эмульсии может служить молоко. Желчь в особенности обладает свойством эмульгировать жиры, так как содержит соли желчных кислот, сильно понижающие поверхностное натяжение. Это свойство желчи имеет большое значение для переваривания жиров в организме, так как во много раз увеличивает поверхность соприкосновения жира с липазой поджелудочной железы.

Приборы. 1. Штатив с сухими пробирками.

2. Водяная баня.

Реактивы. 1. Бензин или керосин.

2. Бензол.

3. Хлороформ.

4. Четыреххлористый углерод.

5. Диэтиловый эфир.

6. Этиловый спирт.

7. Подсолнечное масло или какой-либо другой жир.

8. Раствор белка (приготовление см. стр. 329, п. 36).

9. Едкое кали, 1% раствор.
10. Натрий углекислый, 1% раствор.
11. Мыло, 1% раствор.
12. Желчь.

Ход работы

I. 1. Помещают в 6 сухих пробирок по 3—4 капли исследуемого жира.

2. Добавляют в первую пробирку 2—3 мл бензина или керосина, а во вторую — 2—3 мл бензола и далее, добавляют в соответствующие пробирки хлороформ, четыреххлористый углерод, диэтиловый эфир и, наконец, этиловый спирт. Наблюдают хорошую растворимость жира во всех указанных растворителях и слабую в спирте¹.

II. 1. В 6 пробирок помещают по 3—4 капли исследуемого жира и по 2—3 мл дистиллированной воды. Необходимо следить за тем, чтобы количество как воды, так и жира в разных пробирках было приблизительно одинаковое.

2. Добавляют в первую пробирку несколько капель раствора белка, во вторую — несколько капель раствора едкого кали, в третью — несколько капель раствора соды, в четвертую — несколько капель раствора мыла, в пятую — несколько капель желчи и, наконец, в шестую пробирку не добавляют ничего (она будет служить контролем).

3. Помещают на короткое время все шесть пробирок в горячую водяную баню для расплавления жира. Если жир жидкий, то нагревание в бане излишне. Взбалтывают содержимое всех пробирок, ставят их по порядку в штатив и наблюдают образование в первых пяти пробирках относительно устойчивой эмульсии, а в шестой пробирке (контроль) — расслоение неустойчивой эмульсии на жир и воду.

ПЕРЕВАРИВАНИЕ ЖИРОВ

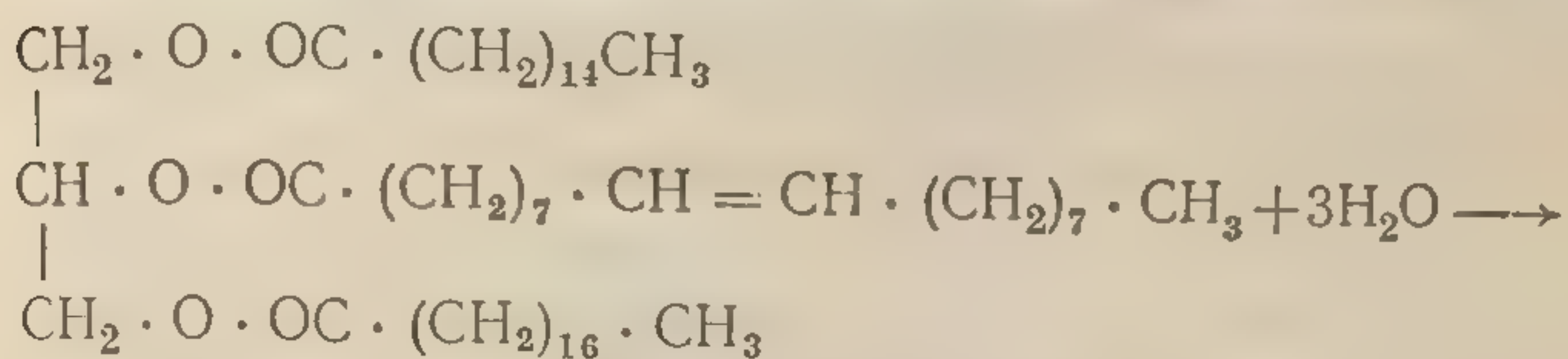
Переваривание (гидролиз) жиров у человека начинается, хотя и в незначительной степени, в желудке. Главным местом переваривания жиров является двенадцатиперстная кишка. Ли-

¹ Во избежание пожара при исследовании жиров на их растворимость в комнате необходимо потушить все горелки. Водяная баня должна быть предварительно нагрета до кипения. Когда исследование закончится, огнеопасные реактивы следует унести из комнаты, и только после этого можно зажигать огонь.

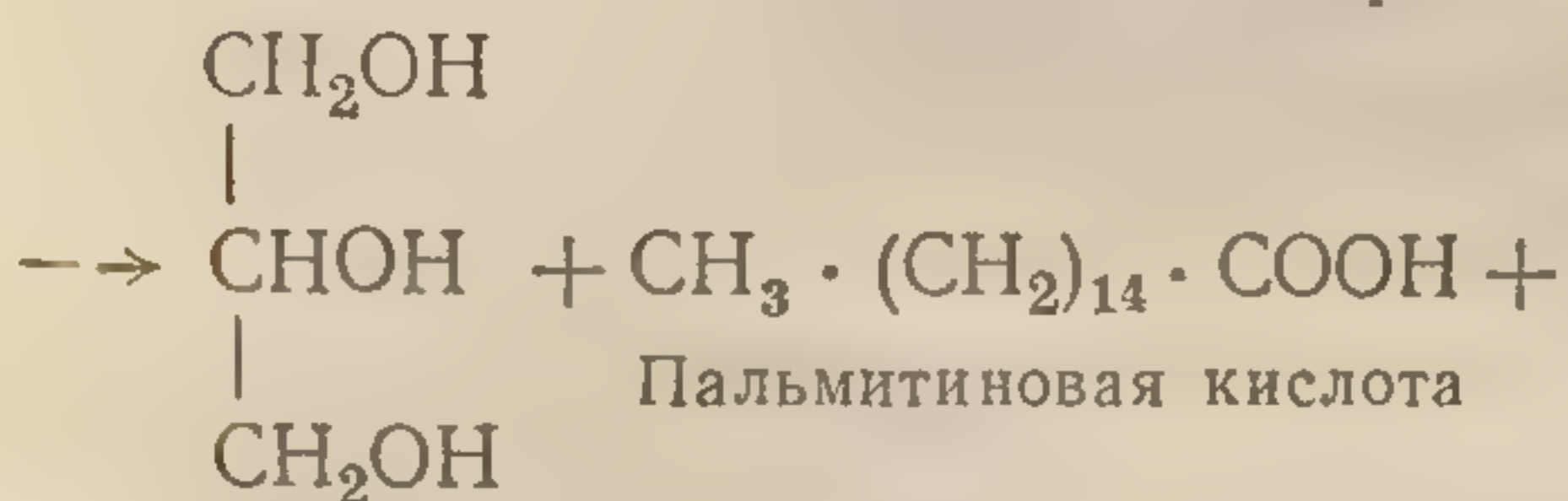
паза панкреатического сока выделяется поджелудочной железой частично в неактивном состоянии; неактивная липаза под действием желчи переходит в активную. Липаза поджелудочного сока проявляет свое действие как в щелочной, так и в нейтральной и кислой средах¹. В кишечном соке также содержится липаза.

В результате действия липаз жиры подвергаются гидролизу, расщепляясь при этом на глицерин и жирные кислоты.

Так, например, гидролиз триглицерида — пальмитоолеостеарина — протекает по следующему уравнению:

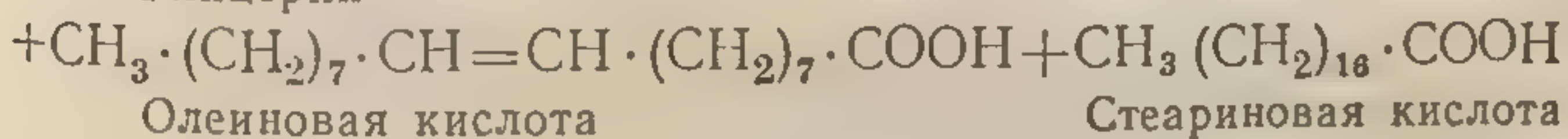


Пальмитоолеостеарин



Пальмитиновая кислота

Глицерин



Олеиновая кислота

Стеариновая кислота

Гидролиз жиров удобнее всего наблюдать при помощи липазы панкреатического сока. В качестве субстрата лучше всего взять молоко, жир которого, находясь в эмульгированном состоянии, быстро расщепляется на глицерин и жирные кислоты. Последние можно оттитровать щелочью.

П р и б о р ы. 1. Конические колбы емкостью на 250 мл, 4 шт.

2. Мерный цилиндр на 50 мл.

3. Водяная баня.

4. Термометр.

5. Пипетки на 10 мл.

6. Пипетки на 2 мл.

¹ Оптимум pH поджелудочной липазы колеблется в пределах от 7,0 до 9,5 в зависимости от субстрата.

7. Фарфоровая ступка с пестиком.
8. Ножницы.
9. Воронка.
10. Фарфоровая чашка.
11. Штатив с пробирками.
12. Марля.

Р е а к т и в ы. 1. Поджелудочная железа (например, свиньи) свежая¹.

2. Молоко, прокипяченное и охлажденное до 37°.

3. Фенолфталеин, 0,1% раствор в спирте.

4. Едкий натр, 0,1 н. раствор.

5. Желчь.

Х о д р а б о т ы

1. Очищают поджелудочную железу от жира и измельчают ее ножницами².

2. Около 5 г измельченной поджелудочной железы помещают в ступку и тщательно растирают с 10—15 мл воды в течение 4—5 минут.

3. Полученную смесь отфильтровывают в пробирку через 2—3 слоя марли.

4. В две колбы (№ 1 и 2) отмеривают цилиндром по 50 мл молока и добавляют в каждую колбу по 2 мл отфильтрованной вытяжки липазы. В колбу № 1 добавляют, кроме того, 5—6 капель желчи (для активирования липазы).

5. Быстро перемешивают содержимое каждой колбы. Сейчас же отбирают по 10 мл жидкости и переносят их в две другие колбы (для титрования).

6. Первые две колбы (№ 1 и 2) помещают в водяную баню при 37°.

7. В колбы для титрования прибавляют по 10 мл дистиллированной воды и по 2—3 капли раствора фенолфталеина³.

8. Оттитровывают содержимое каждой колбы 0,1 н. щелочью до слабозеленого окрашивания при непрерывном и тща-

¹ Можно пользоваться готовой вытяжкой липазы (приготовление см. стр. 322, п. 6).

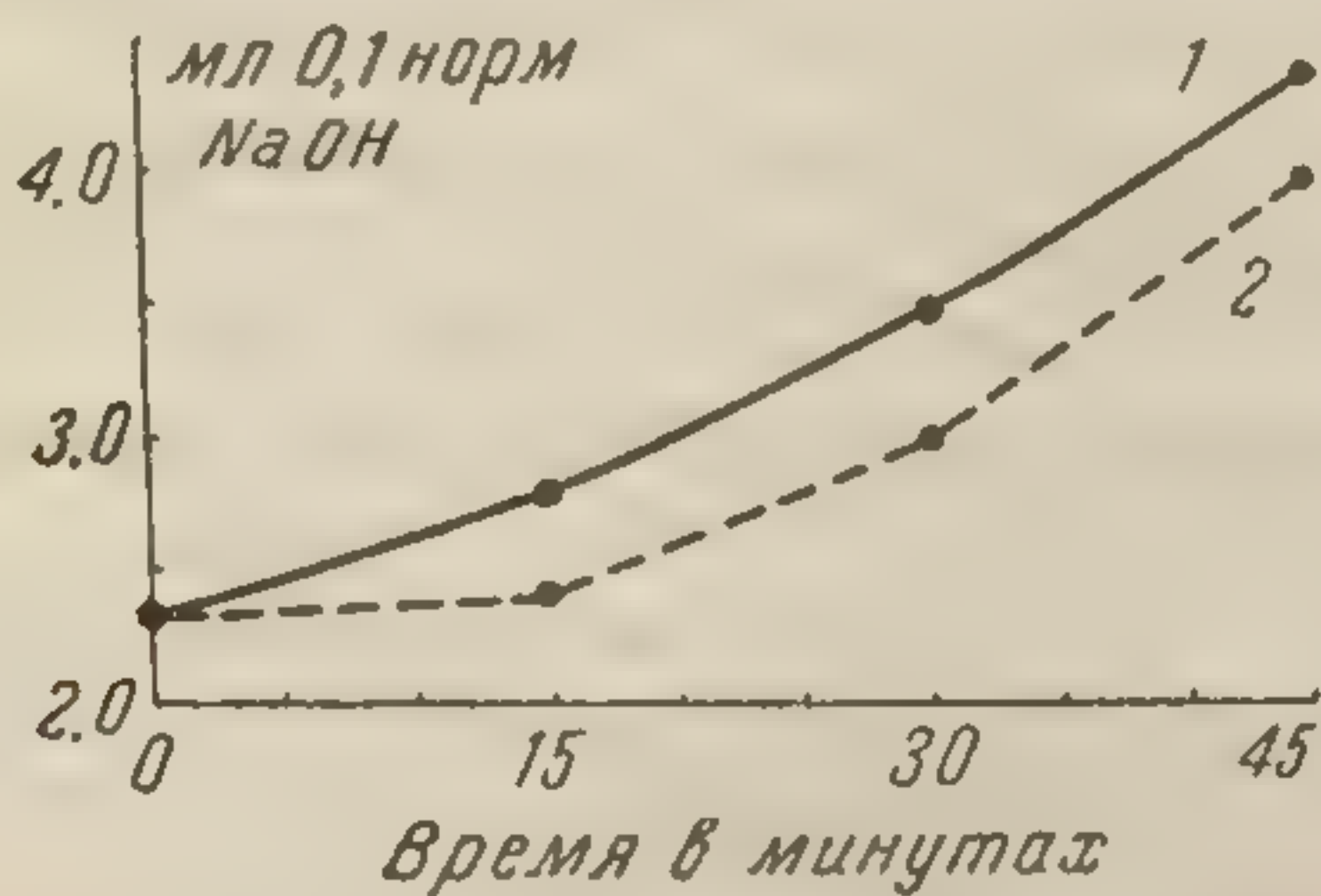
² Измельчение можно вести в фарфоровой чашке. Если необходимо большое количество липазы, то можно пользоваться мясорубкой.

³ В качестве индикатора пользуются фенолфталеином, так как титруют слабую кислоту сильным основанием и образующаяся при нейтрализации соль, вследствие гидролиза ее, дает слабо щелочную реакцию.

тельном помешивании. По окончании титрования записывают результаты; содержимое выливают и колбы тщательно моют.

9. Еще три-четыре раза через каждые 15 минут берут из колбы № 1 и колбы № 2 пробы по 10 мл и оттитровывают их с водой и фенолфталеином, как описано выше.

10. Сравнивают объемы 0,1 н. щелочи, пошедшие на титрование каждой пробы из колб № 1 и 2, и, откладывая их по времени, вычерчивают кривые расщепления жира.



1- липаза, активированная желчью
2- липаза без желчи

Рис. 7. Кривые расщепления жира.
1—липаза, активированная желчью; 2—липаза без желчи.

Так как гидролиз идет постепенно, количество освобождающихся жирных кислот нарастает во времени (рис. 7).

Как видно из приведенного примера (рис. 7), желчь (собственно соли желчных кислот) имеет большое значение для переваривания даже такого сильно эмульгированного жира, как жир молока. Роль желчи для переваривания других жиров еще важнее, так как, помимо активации липазы, желчь переводит жиры в эмульгированное состояние (а также способствует всасыванию жирных кислот).

При недостаточном поступлении желчи в кишечник жиры переходят в кал почти неизменными. Так, например, при закупорке желчного протока в кале обнаруживается много неусвоенного жира.

РЕАКЦИИ НА АЦЕТОНОВЫЕ ТЕЛА

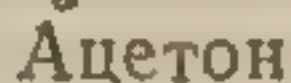
Ацетоновыми, или кетонowymi, телами называют ацетон — $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_3$, ацетоуксусную кислоту — $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$ и β -оксимасляную кислоту — $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$.

При нарушении окисления этих веществ они обнаруживаются в моче наряду с ацетоном, который образуется из ацетоуксусной кислоты в результате декарбоксилирования:



Особенно резкое повышение содержания ацетоновых тел наблюдается в моче больных диабетом.

Ацетон может быть открыт по образованию
иодоформа при реакции с иодом в присутствии щелочи:



П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.

- Р е а к т и в ы.** 1. Ацетон, 0,5% раствор.

- ¹ Ацетоуксусная кислота нестойка, поэтому обычно пользуются устойчивым этиловым эфиром ацетоуксусной кислоты.

3. Едкий натр, 10% раствор.
4. Раствор иода в иодистом калии (приготовление см. стр. 329, п. 39).
5. Уксусная кислота, концентрированная.
6. Нитропруссид натрия, 10% раствор, свежеприготовленный.
7. Аммиак, концентрированный раствор.
8. Хлорное железо, 10% раствор.
9. Моча, содержащая ацетоновые тела.
10. β -Оксимасляная кислота, 1% раствор.
11. Перекись водорода, 3% раствор.

Ход работы

I. Реакция на образование иодоформа

1. В пробирку наливают 1—2 мл раствора ацетона, добавляют около 1 мл раствора едкого натра и 5—7 капель раствора иода в иодистом калии.

Выпадает желтоватый осадок иодоформа, который легко обнаруживается по характерному запаху.

2. Прodelывают реакцию с исследуемой мочой.

II. Реакция с нитропруссидом

1. Наливают в одну пробирку 1—2 мл раствора ацетона, а в другую пробирку — такое же количество раствора ацетоуксусного эфира.

2. В обе пробирки прибавляют по 0,4—0,5 мл концентрированной уксусной кислоты и по 5—7 капель раствора нитропрусида натрия.

3. Встряхивают содержимое каждой пробирки и осторожно наслаивают по 1—2 мл концентрированного раствора аммиака.

В присутствии ацетона или ацетоуксусной кислоты (т. е. в обеих пробирках) образуется пурпурно-фиолетовое кольцо.

4. Прodelывают реакцию с исследуемой мочой.

III. Проба на ацетоуксусную кислоту с хлорным железом

1. Наливают в пробирку 1—2 мл раствора ацетоуксусного эфира и прибавляют 4—5 капель раствора хлорного железа. Наблюдают вишневокрасное окрашивание.

Окраска обязана комплексному соединению железа с энольной формой ацетоуксусной кислоты (или ацетоуксусного эфира).

2. Прodelывают реакцию с исследуемой мочой.

От первых капель хлорного железа в моче образуется осадок фосфата железа. Когда образование осадка прекратится, добавляют еще 4—5 капель раствора хлорного железа.

IV. Реакция на β -оксимасляную кислоту

1. В стаканчик к 10 мл раствора β -оксимасляной кислоты (или исследуемой мочи) приливают 10 мл дистиллированной воды и несколько капель уксусной кислоты

2. Упаривают под тягой жидкость в стаканчике до половины первоначального объема. При этом отгоняется ацетон и разрушается ацетоуксусная кислота, а β -оксимасляная кислота остается неразрушенной. Дают жидкости остыть и переливают ее в пробирку.

3. Прибавляют в пробирку 1 мл перекиси водорода, нагревают 1 минуту и дают остыть. β -Оксимасляная кислота окисляется в ацетоуксусную.

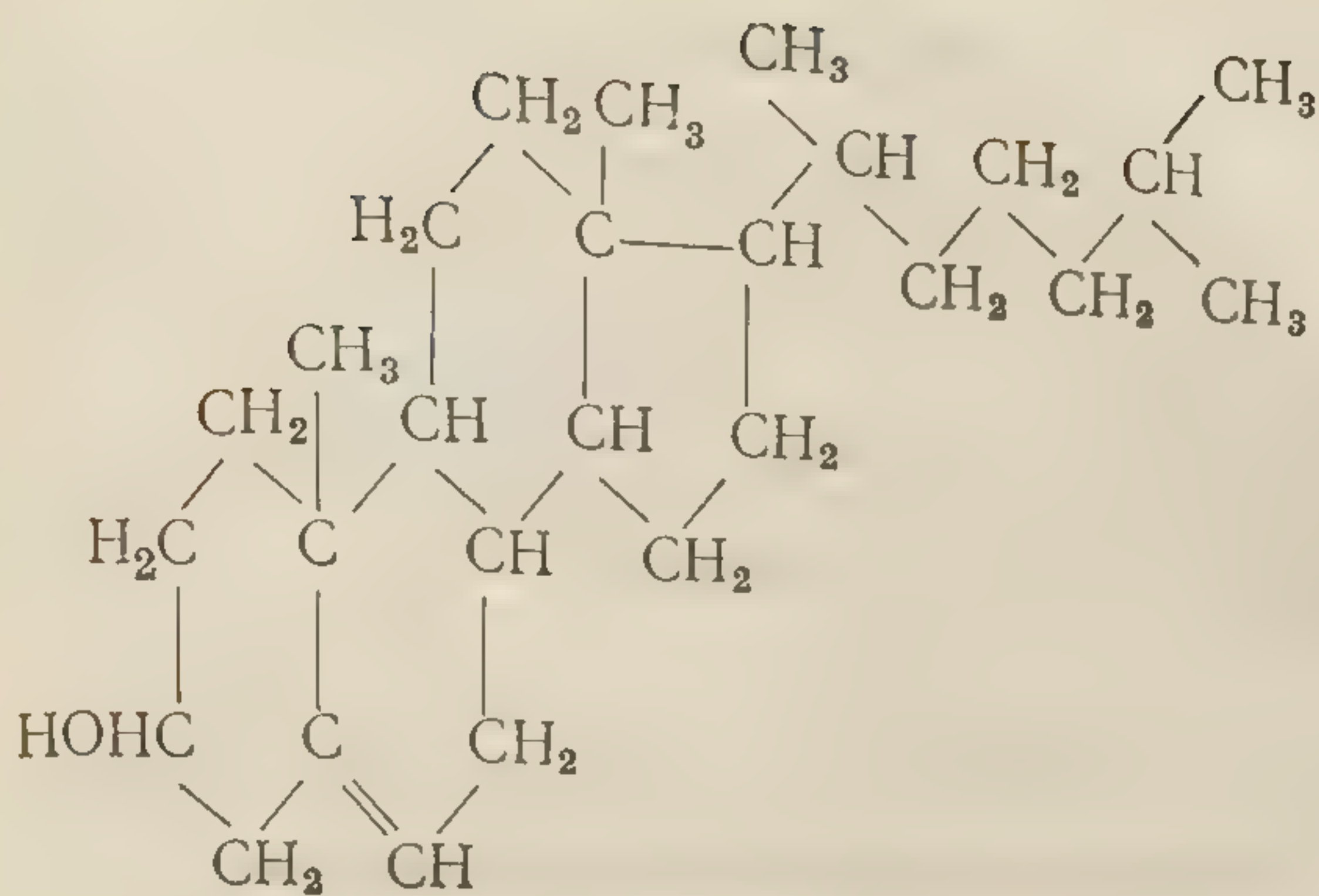
4. Обнаруживают образовавшуюся ацетоуксусную кислоту реакцией с нитропруссидом.

РЕАКЦИИ НА ХОЛЕСТЕРИН

Х о л е с т е р и н (холестерол) является сложным однокольцевым циклическим вторичным спиртом. Так же как и многие биологически важные липиды (различные стеринны, желчные кислоты, половые гормоны и гормоны коры надпочечника, витамин D и др.) холестерин является производным циклопентанопергидрофенантрена.



Циклопентанопергидрофенантрен



Холестерин

Холестерин в виде сложных эфиров (холестеридов) или в свободном виде встречается в каждой клетке человека и животных. Особенно много холестерина в мозгу, желчи, сперме, кожном сале. В желчных камнях содержание холестерина иногда достигает 90%. Много содержится холестерина в овечьем кожном сале. Ланолин, употребляемый в медицине и получаемый из кожного овечьего сала, представляет собой главным образом эфиры холестерина, содержащие воду.

Холестерин растворяется в жирах и растворителях жиров (бензоле, хлороформе, эфире, горячем спирте и др.).

Холестерин кристаллизуется из эфирно-спиртового раствора в виде характерных пластинчатых кристаллов (рис. 8).

Для обнаружения холестерина применяется ряд цветных реакций. Химизм этих реакций на холестерин обусловлен переводом его, путем отнятия элементов воды, из вторичного спирта в непредельный углеводород.

- П р и б о р ы.
1. Штатив с сухими пробирками.
 2. Пипетка.
 3. Микроскоп.
 4. Предметное стекло.

- Р е а к т и в ы.
1. Холестерин, 2% раствор в смеси спирта с эфиром (1 : 2 по объему).
 2. Холестерин, 0,3% раствор в сухом хлороформе.

3. Холестерин, 0,1% раствор в ледяной уксусной кислоте.
4. Серная кислота, удельного веса 1,82 (приготовление см. стр. 332, п. 54).
5. Серная кислота, концентрированная.
6. Уксусный ангидрид.
7. Хлористый бензоил (хранить в вытяжном шкафу).
8. Хлористый цинк, кристаллический.

Х о д р а б о т ы

I. Кристаллы холестерина

На предметное стекло наносят пипеткой 1—2 капли эфирно-спиртового раствора холестерина и дают спирту и эфиру испариться до выпадения кристаллов.

2. Выпавшие кристаллы холестерина рассматривают под микроскопом (рис. 8).

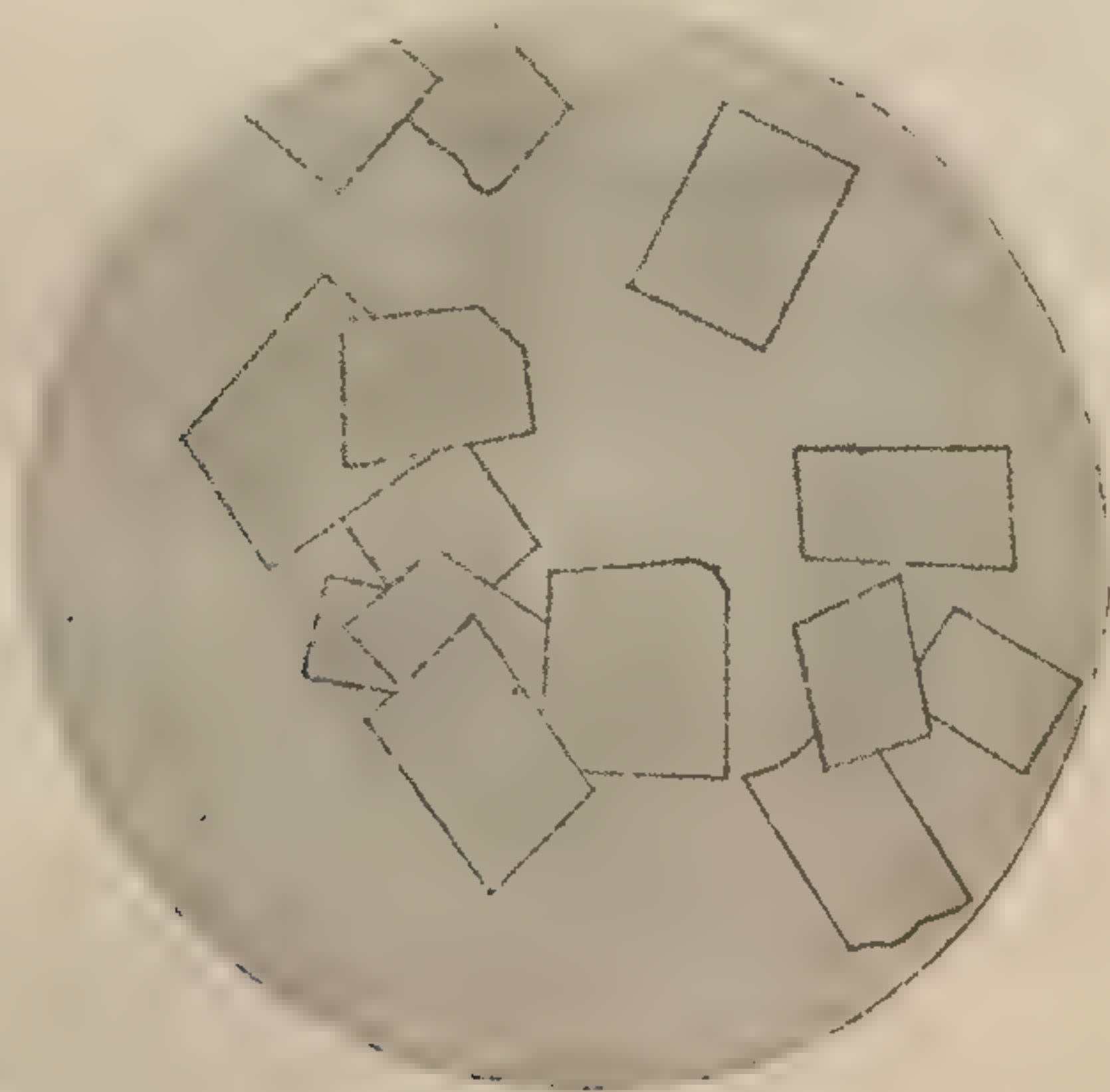


Рис. 8. Кристаллы холестерина.

II. Реакция с серной кислотой (Сальковского)

1. В сухую пробирку наливают приблизительно по 1 мл хлороформного раствора холестерина и серной кислоты, удельного веса 1,82.

2. Осторожно встряхивая пробирку, перемешивают содержимое. Когда жидкость отстоится, верхний хлороформный слой оказывается окрашенным в красный цвет, нижний — в желто-красный цвет с зеленой флюоресценцией.

III. Реакция с уксусным ангидридом

1. В пробирку наливают 1—2 мл хлороформного раствора холестерина, приливают 6—7 капель уксусного ангидрида и 1—2 капли концентрированной серной кислоты. Жидкость хорошо взбалтывают и наблюдают образование сначала синей, затем сине-зеленой и, наконец, зеленой окраски. При незначительных количествах холестерина в растворе может сразу появиться зеленая окраска. Растворы, содержащие больше холестерина (1% и выше), дают сначала красную окраску, быстро переходящую в фиолетовую, синюю и, наконец, зеленую.

IV. Реакция Чугаева¹

1. В пробирку наливают около 1 мл хлористого бензоила. Добавляют 5—10 капель раствора холестерина в уксусной кислоте и щепотку (0,1—0,2 г) хлористого цинка.

2. Пробирку осторожно нагревают на небольшом пламени и наблюдают малиновое окрашивание раствора.

ОБНАРУЖЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА В МОЗГУ

Нервная ткань очень богата холестерином. После высушивания мозга холестерин можно извлечь хлороформом и обнаружить его характерными реакциями.

П р и б о р ы.

1. Штатив с сухими пробирками.
2. Фарфоровая ступка.
3. Стеклянная пластинка размером около 10 × 10 см.
4. Сушильный шкаф с термометром.
5. Деревянная лопаточка.
6. Нож.
7. Пипетки.

Р е а к т и в ы.

1. Мозг.
2. Гипс.
3. Хлороформ свежеперегнанный.

¹ Работу нужно проводить под тягой, так как хлористый бензоил ядовит. Нагревать необходимо осторожно (реакция протекает бурно).

4. Серная кислота, удельного веса 1,82 (приготовление см. стр. 332, п. 54).
5. Серная кислота, концентрированная.
6. Уксусный ангидрид.

Ход работы

1. Тщательно растирают в фарфоровой ступке 3—5 г мозга с 2 частями (приблизительно) гипса.
2. Размазывают лопаточкой густую массу тонким слоем по стеклянной пластинке и высушивают в сушильном шкафу при 40°.
3. Сухую массу счищают ножом в сухую ступку, растирают и переносят в сухую пробирку.
4. Полученный порошок заливают 5—6 мл хлороформа и содержимое пробирки тщательно взбалтывают в течение 5—10 минут.
5. Фильтруют в сухую пробирку через сухой фильтр.
6. С полученным фильтратом проводят реакцию с серной кислотой и реакцию с уксусным ангидридом.

• КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА В КРОВИ ПО ЭНГЕЛЬГАРДТУ И СМИРНОВОЙ

В норме цельная кровь человека содержит 150—200 мг% холестерина. В плазме крови большая часть холестерина находится в виде сложных эфиров, эритроциты же содержат только свободный холестерин.

Повышение содержания холестерина в крови (гиперхолестеринемия) имеет место при диабете, атеросклерозе, липоидном нефрите, непроходимости желчных путей. При различных видах малокровия, некоторых болезнях печени и надпочечников содержание холестерина в крови понижено.

Количественное определение холестерина в крови основано на реакции холестерина с уксусным ангидридом. Содержание холестерина определяется по интенсивности зеленой окраски методом колориметрии.

Необходимо ознакомиться с основами метода колориметрии, широко применяемой в различных количественных определениях.

Сущность колориметрического метода заключается в том, что определяемое вещество добавлением соответствующего

реагента переводят в цветное соединение, окрашивающее раствор. Одновременно действием того же реагента на известное количество определяемого вещества получают окраску, по интенсивности соответствующую известной концентрации. С этим так называемым стандартным раствором и сравнивают окраску исследуемого раствора.

Необходимым условием колориметрических определений является прямая пропорциональность между концентрацией исследуемого вещества и интенсивностью окраски, получаемой при данной реакции; кроме того, окраска жидкости тем сильнее, чем толще ее слой. Если сравнивать два окрашенных раствора одного и того же вещества в одном и том же растворителе, то при одинаковой интенсивности окраски концентрации растворов обратно пропорциональны толщине их слоев (отсчетам шкалы), или произведение из концентрации одного (стандартного) раствора (C_1) на толщину его слоя (h_1) равняется произведению из концентрации другого (исследуемого) раствора (C_2) на толщину его слоя (h_2).

$$\frac{h_1}{h_2} = \frac{C_2}{C_1} \quad \text{или} \quad C_1 h_1 = C_2 h_2.$$

Таким образом, зная концентрацию стандартного раствора и толщину слоев обоих растворов, мы можем найти концентрацию исследуемого вещества в испытуемом растворе:

$$C_2 = \frac{C_1 h_1}{h_2}.$$

При колориметрических анализах важно точно соблюдать условия опыта, так как на точность получаемых результатов оказывает влияние ряд обстоятельств.

В частности, пропорциональность интенсивности окраски количеству исследуемого вещества обычно имеет место лишь в узких пределах концентрации.

Поэтому работа как с очень концентрированными растворами, так и со слишком разбавленными вызывает большие ошибки.

Необходимо также, чтобы разница в концентрации стандартного и испытуемого растворов была не слишком велика (не более чем в полтора раза). Ошибка может проистекать

и от неодинаковой температуры или различного цвета (или даже оттенка) колориметрируемых растворов.

Существует много различных типов колориметров. Мы остановимся на описании колориметра Дюбоска как на наиболее распространенной системе¹.

Как видно из схемы колориметра (рис. 9), свет отражается от пластинки и проходит через стеклянные ста-

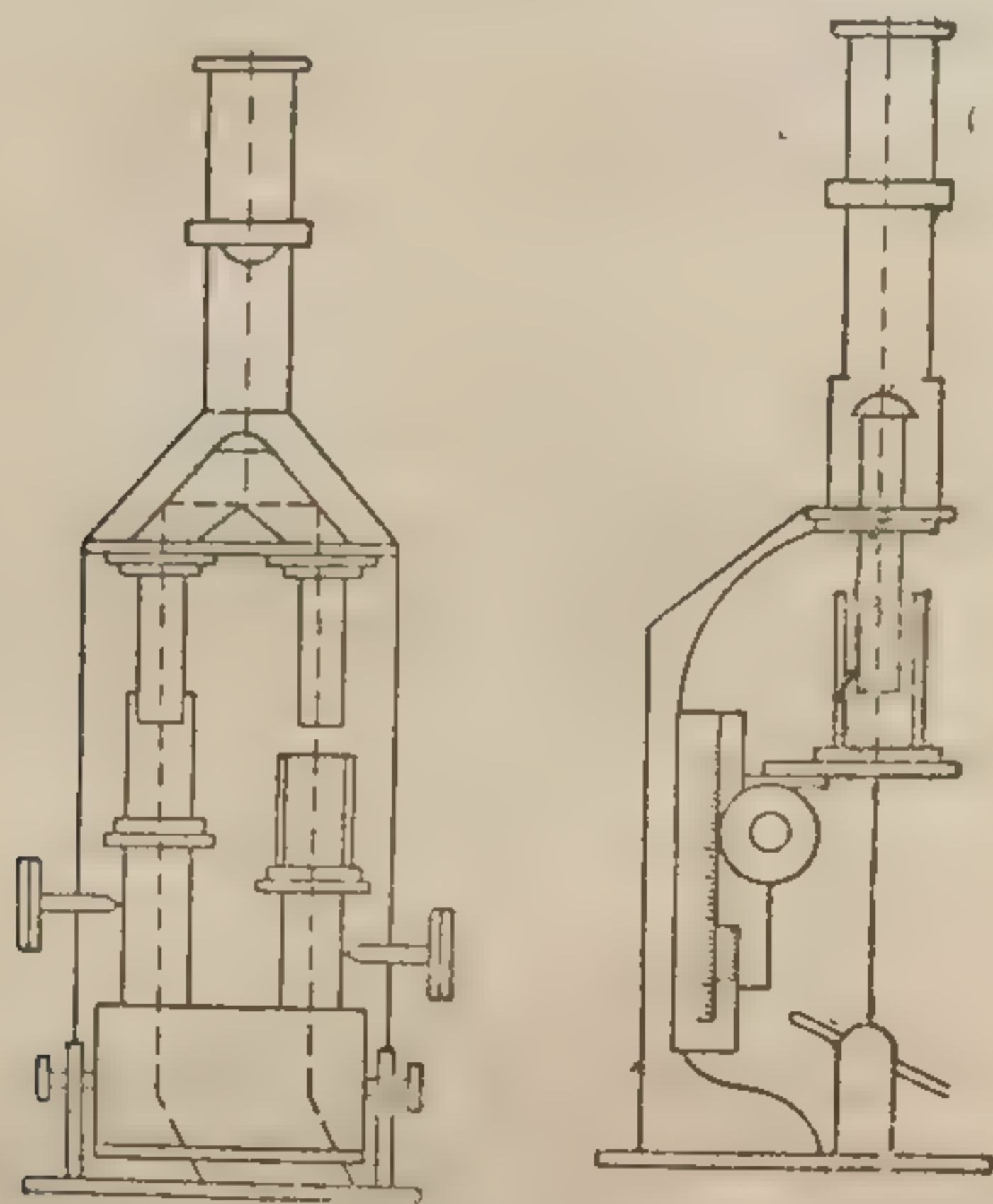


Рис. 9. Схема колориметра.

канчики, содержащие стандартный и исследуемый растворы. Стаканчики могут передвигаться вверх и вниз и при колориметрировании должны быть подняты так, чтобы стеклянные цилиндры были погружены в соответствующие растворы. Свет, пройдя через слой колориметрируемых растворов, поступает в цилиндры; затем в специальной призме световые лучи преломляются таким образом, что при наблюдении через окуляр правая половина поля будет

¹ В последнее время для колориметрических определений широко применяются так называемые фотоколориметры, т. е. приборы, в которых интенсивность проходящего света измеряется при помощи фотоэлемента. При работе на фотоколориметре концентрацию исследуемого вещества определяют по специально составленной стандартной кривой. Благодаря объективному измерению интенсивности света, высокой чувствительности прибора и применению светофильтров, пользование фотоколориметром дает значительный выигрыш в точности определения и в затрачиваемом времени.

соответствовать левому цилиндру, а левая половина поля — правому цилиндру.

Колориметрированию предшествует обработка растворов, при которой в каждом растворе развивается окраска, пропорциональная количеству исследуемого вещества. Такая обработка производится в мерной посуде.

Прежде чем колориметрировать, в оба стаканчика колориметра наливают один и тот же раствор (например, стандартный), погружают в раствор оба цилиндра и закрепляют их на одной и той же высоте. Затем колориметр у с т а н а в л и в а ю т, т. е. находят такое положение прибора относительно источника света (окна или лампы), при котором яркость обеих полей (правой и левой половинок) была бы одинакова, т. е. сила света, идущего через каждый стаканчик и цилиндр, сравнялась бы.

После этого стандартный и исследуемый растворы соответственно наливают в стаканчики колориметра; вращением кремальеры поднимают стаканчики так, чтобы концы цилиндров были погружены в жидкость, и, смотря в окуляр, находят то положение, при котором интенсивность окраски обеих полей станет одинаковой, после чего приступают к отсчетам.

Обычно в левый стаканчик наливают стандартный раствор и закрепляют его на определенной высоте (например, при толщине слоя в 30,0 мм) и подводят стаканчик с испытуемым раствором кремальерой попеременно, то сверху (от более светлого поля), то снизу (от более темного поля) до одинаковой окраски.

Каждый раз отмечают по шкале, пользуясь нониусом¹, толщину слоя испытуемого раствора. Произведя несколько отсчетов, находят среднее арифметическое для толщины слоя испытуемого раствора (h_2) и вычисляют концентрацию исследуемого вещества по формуле:

$$C_2 = \frac{C_1 h_1}{h_2}.$$

¹ Пользуясь нониусом, отсчет следует производить с точностью до 0,1 мм. Нониус — прибор для отсчета долей деления того или иного масштаба. Нониус колориметра представляет собой линейку с десятью делениями, которые равны по длине девяти делениям масштаба. Чтобы определить положение какой-либо точки на масштабе, совмещают с ней ноль нониуса и отсчитывают число целых делений по масштабу, а число десятых делений — по тому номеру деления нониуса, который совпал с делением масштаба (см. также стр. 289 и рис. 38).

В. А. Энгельгардтом и Л. Г. Смирновой разработан микрометод, позволяющий определять содержание холестерина в 0,1 мл крови (или сыворотки крови). Липиды крови сначала омыляют едкой щелочью, чтобы перевести весь холестерин в свободное состояние, затем дважды извлекают хлороформом, применяя в качестве водоотнимающего средства высушенный на воздухе фосфорнокислый натрий. Хлороформный экстракт обрабатывают уксусным ангидридом и серной кислотой и колориметрируют по стандартному раствору холестерина в хлороформе, обработанному таким же образом. Поскольку определение производят с небольшими количествами жидкости, необходим колориметр со стаканчиками на малые объемы (микроколориметр).

- П р и б о р ы.**
1. Толстостенные пробирки.
 2. Две пробирки с меткой на 2,5 мл.
 3. Микропипетка на 0,1 мл.
 4. Колориметр на малые объемы.
 5. Водяная баня с вкладышем для пробирок.
 6. Пипетка на 5 мл с делениями.
 7. Игла для взятия крови.
 8. Вата.
 9. Марля.

- Р е а к т и в ы.**
1. Едкое кали, 25% раствор.
 2. Фосфорнокислый натрий двузамещенный с двумя частицами кристаллизационной воды (приготовление см. стр. 333, п. 64).
 3. Уксусный ангидрид.
 4. Серная кислота, концентрированная.
 5. Стандартный раствор, содержащий 20 мг холестерина в 100 мл хлороформа.

Х о д р а б о т ы

1. Делают укол пальца, берут микропипеткой 0,1 мл крови (см. стр. 78) и выдувают кровь на дно толстостенной пробирки.

2. Той же пипеткой отбирают и выпускают в ту же пробирку сначала 0,1 мл дистиллированной воды, а затем 0,1 мл раствора едкого кали.

3. Перемешивают содержимое встряхиванием и ставят пробирку на 30 минут в кипящую водяную баню.

4. Добавляют в пробирку 1,5 мл хлороформа и щепотку (около 0,15 г) фосфорнокислого натрия. Тщательно перемешивают и измельчают содержимое стеклянной палочкой и оставляют пробирку стоять в течение 10 минут.

5. Ставят пробирку в кипящую водяную баню до закипания хлороформа; затем охлаждают пробирку под краном. Соль при этом застывает в комок. Хлороформную вытяжку сливают в пробирку с меткой на 2,5 мл.

6. Таким же образом извлекают остаток холестерина 1 мл хлороформа и сливают экстракт в ту же градуированную пробирку.

7. Одновременно в другую пробирку с меткой отмеривают пипеткой 1 мл стандартного раствора холестерина и доводят хлороформом объем в каждой градуированной пробирке до 2,5 мл.

8. Добавляют в градуированные пробирки по 1 мл уксусного ангидрида и по 3 капли концентрированной серной кислоты. Осторожно перемешивают содержимое каждой пробирки и ставят их в темное место на 25—30 минут для полного развития зеленой окраски.

9. Сравнивают в колориметре интенсивность окраски опытной пробы со стандартной и вычисляют содержание холестерина в крови (в мг%) по формуле:

$$x = \frac{h_c \cdot 20}{h_o \cdot 0,1} \text{ мг\%,}$$

где h_c — высота (толщина слоя) стандартного раствора; h_o — высота опытного раствора; 20 — концентрация холестерина в стандартном растворе в миллиграмм-процентах; 0,1 — количество взятой для анализа крови, в миллилитрах.

Если, например, при высоте стандарта 30 мм, высота опытного раствора 34,7, то концентрация холестерина в крови составляет:

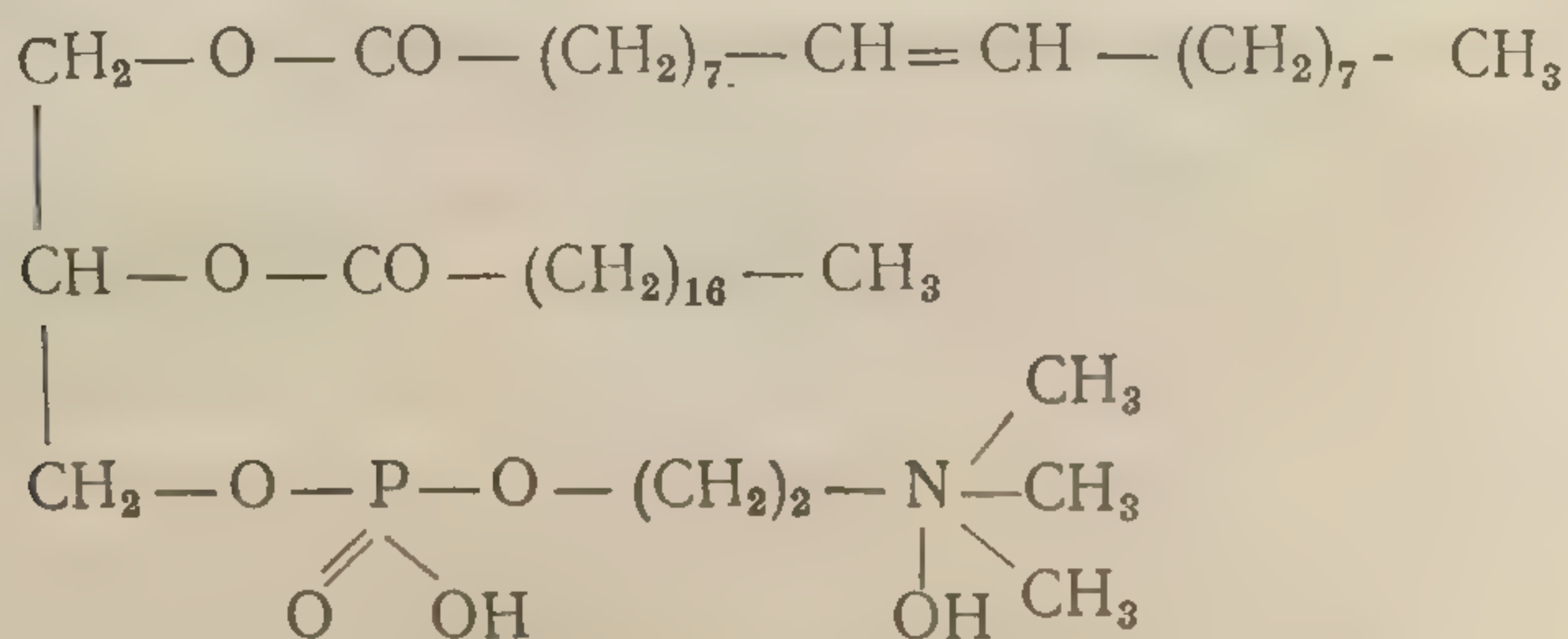
$$\frac{30 \cdot 20}{34,7 \cdot 0,1} = 173 \text{ мг\%}.$$

ОБНАРУЖЕНИЕ ЛЕЦИТИНА В ЖЕЛТКЕ КУРИНОГО ЯЙЦА

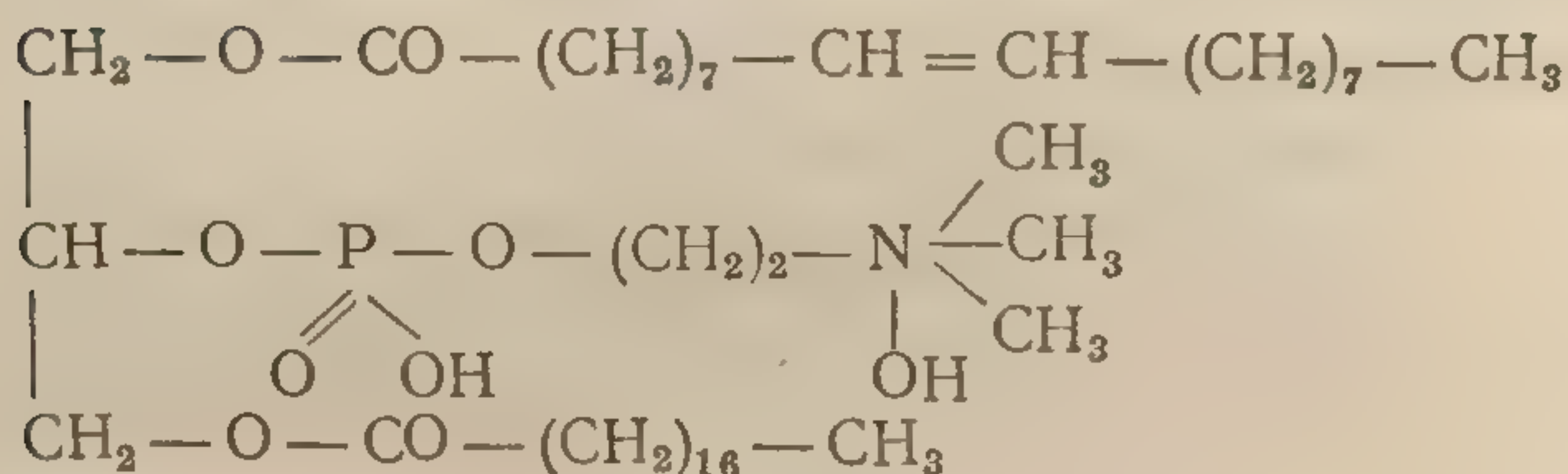
Л е ц и т и н ы принадлежат к м о н о а м и н о ф о с ф а т и д а м. В лецитинах две гидроксильные группы глицерина связаны по типу сложного эфира с двумя молекулами жирных кислот (пальмитиновая, стеариновая, олеиновая и некоторые другие), а третий гидроксил — с фосфор-

ной кислотой, которая в свою очередь соединена по типу сложного эфира со спиртовой группой холина (основание).

Лецитины, у которых группа холинфосфорной кислоты присоединена к первому углеродному атому глицерина называют α -лецитинами. В β -лецитинах эта группа соединена со вторым углеродным атомом глицерина.



α -Лецитин



β -Лецитин

Молекула лецитина обычно находится в виде внутренней соли, образуемой основной группой холина с кислотным остатком фосфорной кислоты.

Наличие одновременно положительного и отрицательного зарядов обуславливает ярко выраженную полярную структуру, где часть с остатками фосфорной кислоты и холина обладает гидрофильными свойствами, т. е. имеет сродство к воде и усиливает растворимость в воде, а остатки жирных кислот гидрофобны и противодействуют растворению в воде. Фактически отношение лецитина к воде представляет собой нечто среднее между указанными свойствами лецитина: лецитин в воде нерастворим, но легко образует с ней очень стойкую эмульсию в виде клейстеровидной массы. Это свойство лецитина давать стойкую эмульсию благоприятствует его переварива-

нию, а также используется в маргариновой и кондитерской промышленности.

Чистый лецитин представляет собой белую воскообразную массу, быстро желтеющую на воздухе. Лецитин хорошо растворим в спирте, хлороформе, эфире, сероуглероде, бензине, но не растворим в ацетоне. Последнее свойство позволяет отделять лецитин от других липидов, которые растворимы в ацетоне.

В настоящее время считают, что каждая клетка организма содержит то или иное количество лецитина. Большое количество лецитина содержится в яичном желтке (до 10%), в нервах, сперме, головном и костном мозгу, надпочечниках, легких, сердце, а также в грибах и дрожжах.

П р и б о р ы. 1. Небольшой стаканчик.
2. Стеклянная палочка.
3. Водяная баня.
4. Воронка.
5. Штатив с сухими пробирками.

Р е а к т и в ы. 1. Желток куриного яйца.
2. Этиловый спирт.
3. Ацетон.

Х о д р а б о т ы

1. Помещают в стаканчик приблизительно $\frac{1}{5}$ часть одного куриного желтка и добавляют при помешивании около 15 мл горячего спирта.

2. По охлаждении смесь фильтруют в сухую пробирку. Если в фильтрате появилась муть, то фильтрование повторяют до получения совершенно прозрачного фильтрата.

3. В другую, сухую пробирку наливают 2—3 мл ацетона и в ацетон по каплям приливают немного полученного фильтрата. Наблюдается появление муты в ацетоне, что указывает на выпадение лецитина, который в ацетоне не растворим.

4. К оставшемуся фильтрату добавляют по каплям дистиллированной воды. Наблюдают образование устойчивой эмульсии лецитина.

УГЛЕВОДЫ И ИХ ОБМЕН

В ряде пищевых продуктов содержатся значительные количества углеводов. Среди них наибольшее пищевое значение имеют крахмал и свекловичный (тростниковый) сахар, хорошо усваиваемые организмом.

Клетчатка для человеческого организма имеет небольшое значение, так как она не переваривается в кишечнике и попадает почти неизменной в кал.

Особенно много крахмала поступает в организм с такими пищевыми продуктами, как хлеб и другие мучные изделия, картофель, крупы и т. п.

В организме углеводы перевариваются в пищеварительном тракте и всасываются в кровь в виде моносахаридов. В печени и мышцах часть углеводов откладывается в виде полисахарида — гликогена.

Углеводы разносятся по организму кровью главным образом в виде глюкозы. Содержание сахара (глюкозы) в крови довольно постоянно и составляет около 100 мг в 100 мл крови. Уровень сахара крови регулируется рядом гормонов. Инсулин снижает сахар крови, адреналин повышает его.

Определение содержания глюкозы в крови и обнаружение ее в моче играют важную роль в клиническом исследовании, так как при некоторых заболеваниях (например, при диабете) имеет место повышенное содержание сахара в крови (гипергликемия) и появление его в моче (глюкозурия).

В мышцах и других тканях углеводы (гликоген и глюкоза) служат главным источником энергии. При достаточном снабжении кислородом они подвергаются там окислению до CO_2 и воды. При недостатке кислорода, что имеет место, например, при усиленной работе, преобладает анаэробный распад угле-

водов до молочной кислоты, называемый гликолизом.

Процесс гликолиза подробно изучен и состоит из ряда отдельных реакций распада, фосфорилирования, окисления и восстановления¹.

Важнейшими промежуточными продуктами обмена углеводов являются: ряд фосфорных эфиров глюкозы, фруктозы и продуктов их распада, пировиноградная кислота, молочная кислота, дикарбоновые кислоты и др.

Под влиянием дрожжей и других микроорганизмов сахара бродят, т. е. подвергаются ферментативному распаду, во многом сходному с гликолизом, но имеющему свои особенности. Так, при спиртовом брожении сахара конечными продуктами являются этиловый спирт и CO_2 , при молочнокислом — молочная кислота, при уксуснокислом — уксусная кислота и т. п..

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА УГЛЕВОДЫ

В научно-исследовательской работе, а также в клиническом анализе, при исследовании пищевых продуктов и т. п. постоянно приходится производить качественные и количественные определения различных углеводов.

Очень чувствительной реакцией на обнаружение углеводов или углеводных компонентов в более сложных веществах (см. стр. 18) является реакция с α -нафтолом или тимолом в присутствии концентрированной серной кислоты. Крахмал легко обнаруживается по образованию синего продукта взаимодействия с иодом (см. стр. 51).

Многие реакции основаны на восстанавливающих свойствах свободных карбонильных групп сахаров. Эти же реакции применяются для большинства количественных методов определения углеводов. Многие сахара могут быть открыты и идентифицированы по образованию осадков — характерных кристаллических соединений с фенилгидразином.

¹ Процессы фосфорилирования и обмена углеводов исследовались В. А. Энгельгардтом, В. А. Белицером, Д. Л. Фердманом, И. И. Ивановым и др.

Фруктозу и другие кетозы обычно обнаруживают пробой Селиванова (красное окрашивание с соляной кислотой и резорцином).

Пентозы при обработке кислотой дают фурфурол, который открывается специальными цветными реакциями.

I. Реакция на обнаружение углеводов

Даже очень малые количества различных углеводов обнаруживаются в присутствии серной кислоты по фиолетовому окрашиванию с α -нафтолом или красному окрашиванию с тимолом.

Проделывают реакции согласно описанию на стр. 18.

II. Реакция на крахмал

Крахмал — высокомолекулярный коллоидный полисахарид; при полном гидролизе распадается на молекулы глюкозы, проходя через ряд промежуточных стадий (см. стр. 50). Характерной реакцией на крахмал является окрашивание с иодом.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. 1. Крахмал, 1% раствор.

2. Раствор иода в иодистом калии (приготовление см. стр. 329, п. 39).

Ход работы

В пробирку наливают около 1 мл раствора крахмала и добавляют 1—2 капли раствора иода. Наблюдают синее окрашивание образовавшегося продукта взаимодействия иода с крахмалом.

III. Реакции на восстанавливающие свойства сахаров

Все моносахариды, а также более сложные сахара, имеющие свободную карбонильную (альдегидную или кетонную) группу, обладают способностью восстанавливать металлы (серебро, медь, висмут, железо и др.) в щелочной среде. Поскольку восстановление металлов происходит при наличии карбонильной группы (или, что то же самое, свободного глюкозидного гидрок-

сила
ления м
ную кар
а имени
(напри
как сах
также в
реакций

Н

НО

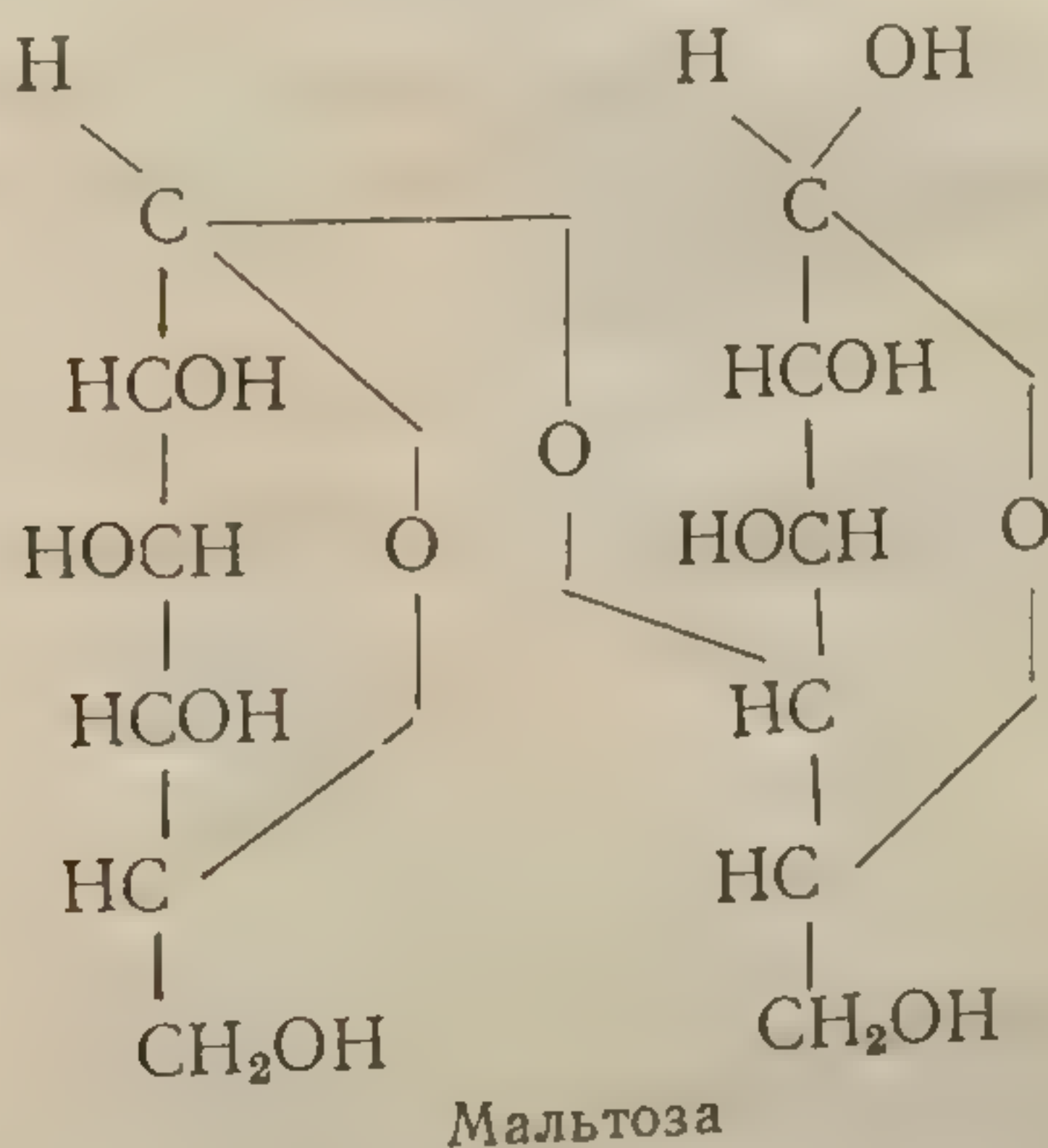
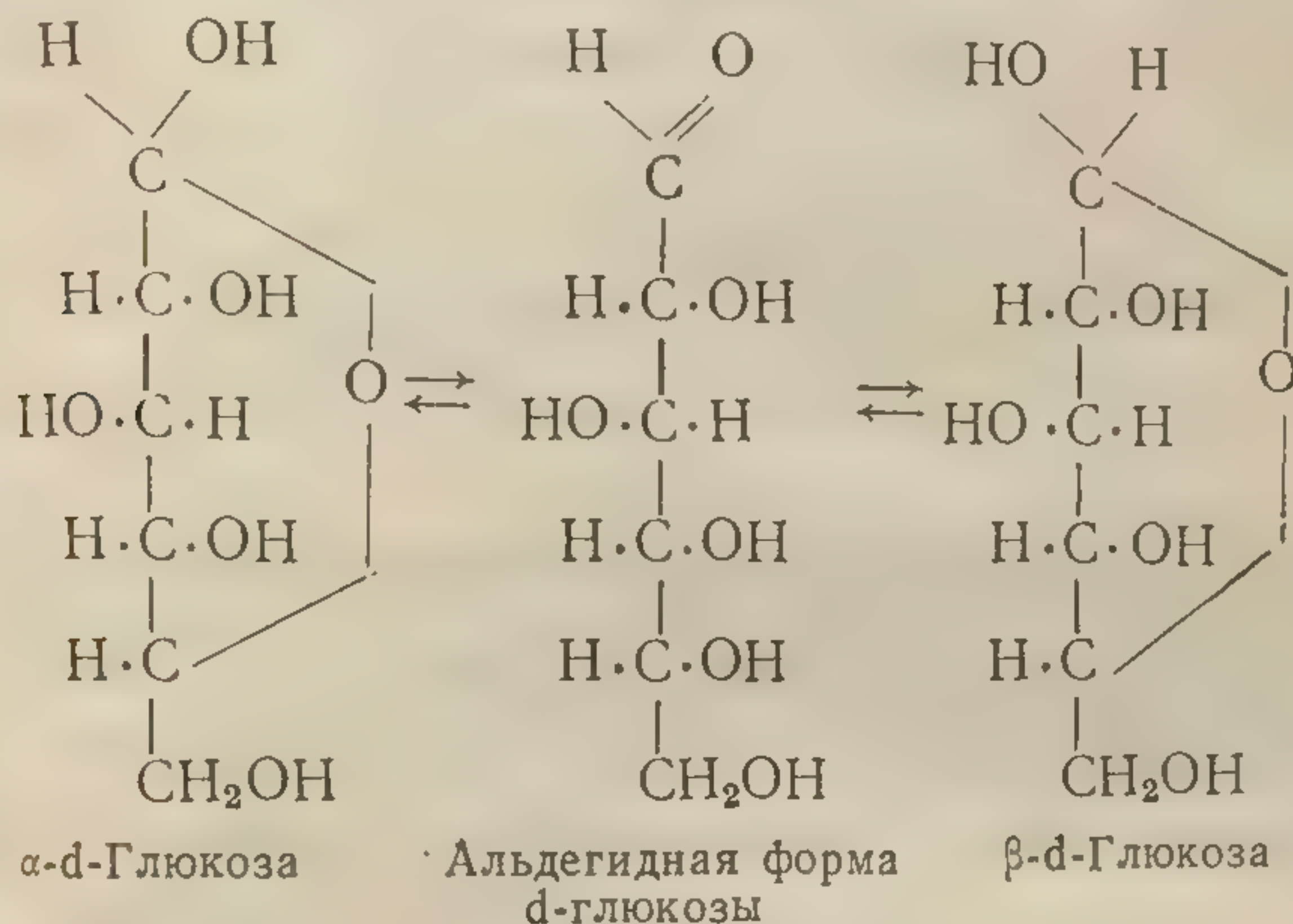
Н

Н

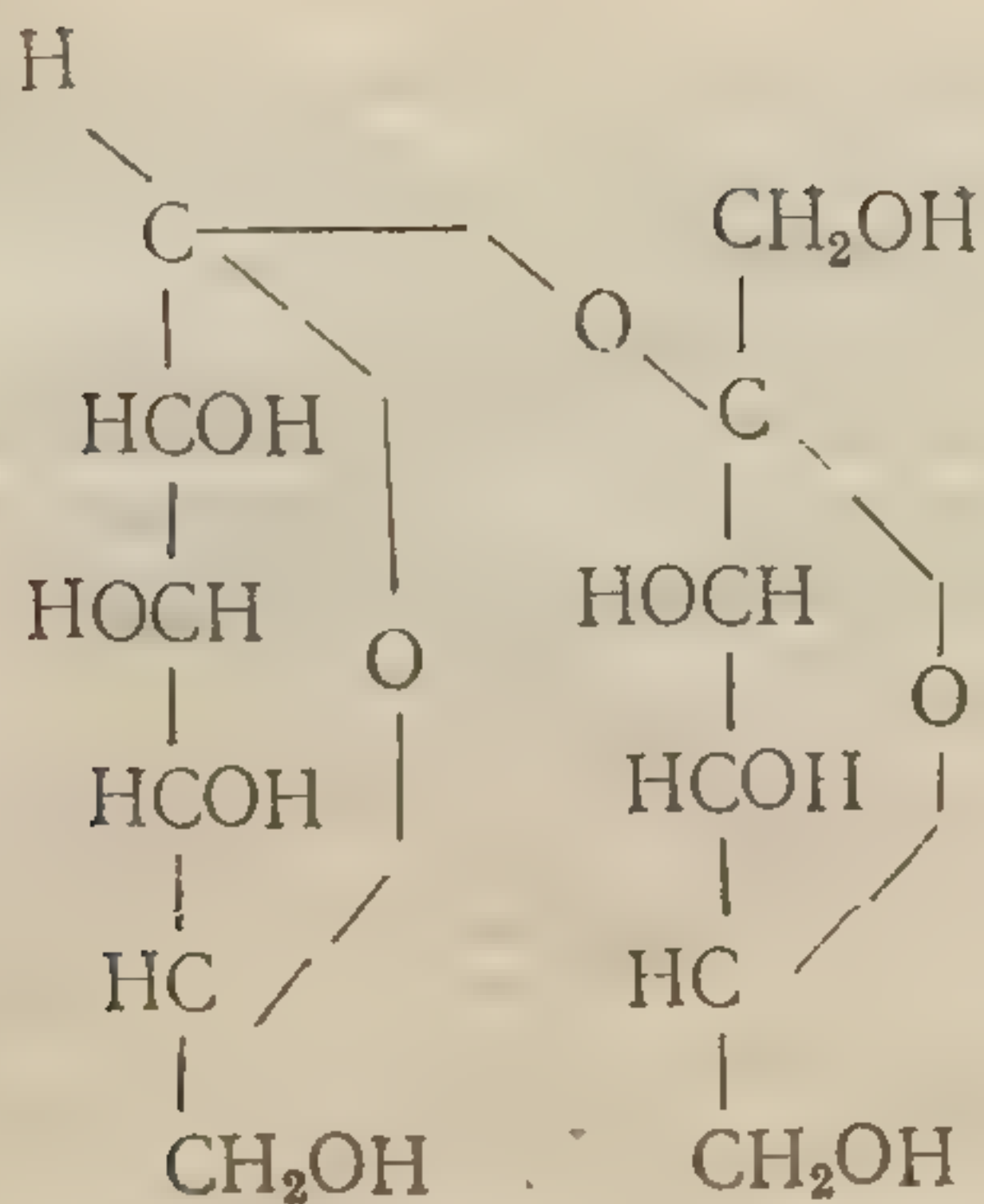
а-д

1 Г л
зывается
в циклич
атома гл
9 Практи

сила ¹⁾ сахара, то, естественно, что реакции восстановления металлов дают только углеводы, имеющие свободную карбонильную группу (или глюкозидный гидроксил), а именно все моносахариды и большинство дисахаридов (например, мальтоза) и трисахаридов. Такие дисахариды, как сахароза, где связаны обе карбонильные группы, а также высокомолекулярные полисахариды, как крахмал, реакций восстановления не дают.



¹ Глюкозидным или полуацетальным называется гидроксил, образующийся на месте карбонильной группы в циклической форме сахара, например, у первого углеродного атома глюкозы (см. формулу).

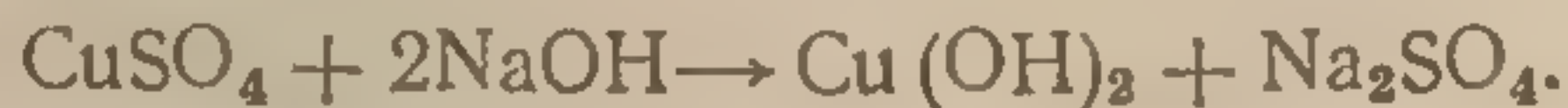


Сахароза

Металлы при этих реакциях восстанавливаются из окисной формы в закисную или даже до свободного состояния. Сахара же дают ряд различных продуктов окисления, вследствие чего написать уравнение окисления сахаров металлами не представляется возможным.

При помощи реакции восстановления металлов обычно производят количественное определение углеводов. В случае моносахаридов определение ведут непосредственно, а полисахариды предварительно подвергают гидролизу, при котором происходит распад на моносахариды и освобождение всех связанных карбонильных групп.

Наиболее употребительна реакция Троммера, заключающаяся в восстановлении окисной меди в закисную. При реакции Троммера сернокислая медь реагирует со щелочью, образуя голубой гидрат окиси меди:

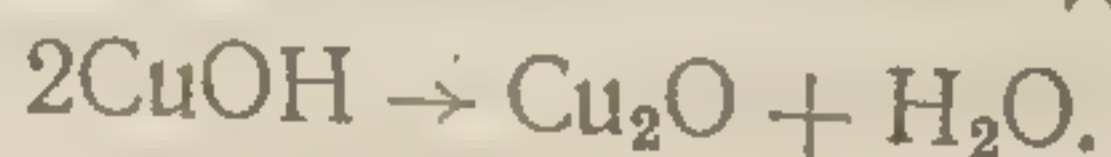


Гидроокись меди частично растворяется, образуя комплексное соединение с сахаром.

При нагревании голубой гидрат окиси меди восстанавливается в желтый гидрат закиси меди:



который при дальнейшем нагревании, теряя воду, переходит в красную закись меди:



Избыток медной соли маскирует реакцию, так как гидроокись меди при нагревании теряет воду и дает черную окись меди:



Нередко пользуются так называемой фелинговой жидкостью, в которой ион двухвалентной меди находится в виде комплексного соединения с виннокислой солью. Механизм реакции с фелинговой жидкостью такой же, как и реакции Троммера. Преимуществом фелинговой жидкости является то, что медь при избытке реактива не выпадает в виде окиси меди. Фелингова жидкость применяется также и для количественного (объемного) определения сахара, например, в моче (см. стр. 287).

Часто применяют также соли висмута (реакция Ниландера). Соли висмута особенно удобны для обнаружения сахара в моче, так как в отличие от меди висмут не восстанавливается мочевой кислотой (см. стр. 215). Висмут восстанавливается сахаром до металла.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы.

1. Глюкоза, 1% раствор.
2. Мальтоза, 1% раствор.
3. Сахароза, 1% раствор.
4. Крахмал, 1% раствор.
5. Едкий натр, 10% раствор.
6. Сернокислая медь, 5% раствор.
7. Фелингова жидкость (приготовление см. стр. 333, п. 59).
8. Реактив Ниландера (приготовление см. стр. 331, п. 49).

Ход работы

А. Реакция Троммера

1. В пробирку наливают 1—2 мл раствора глюкозы и добавляют равный объем раствора едкого натра.

2. Добавляют по каплям раствор медного купороса до появления исчезающей мути гидроокиси меди.

→ H —

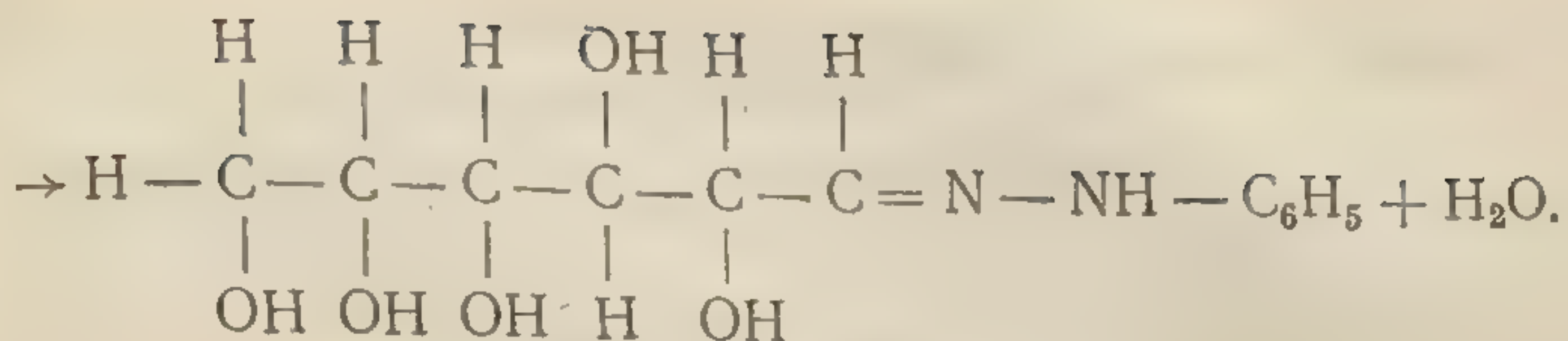
Дале
мая у н
у второ

H

→ H

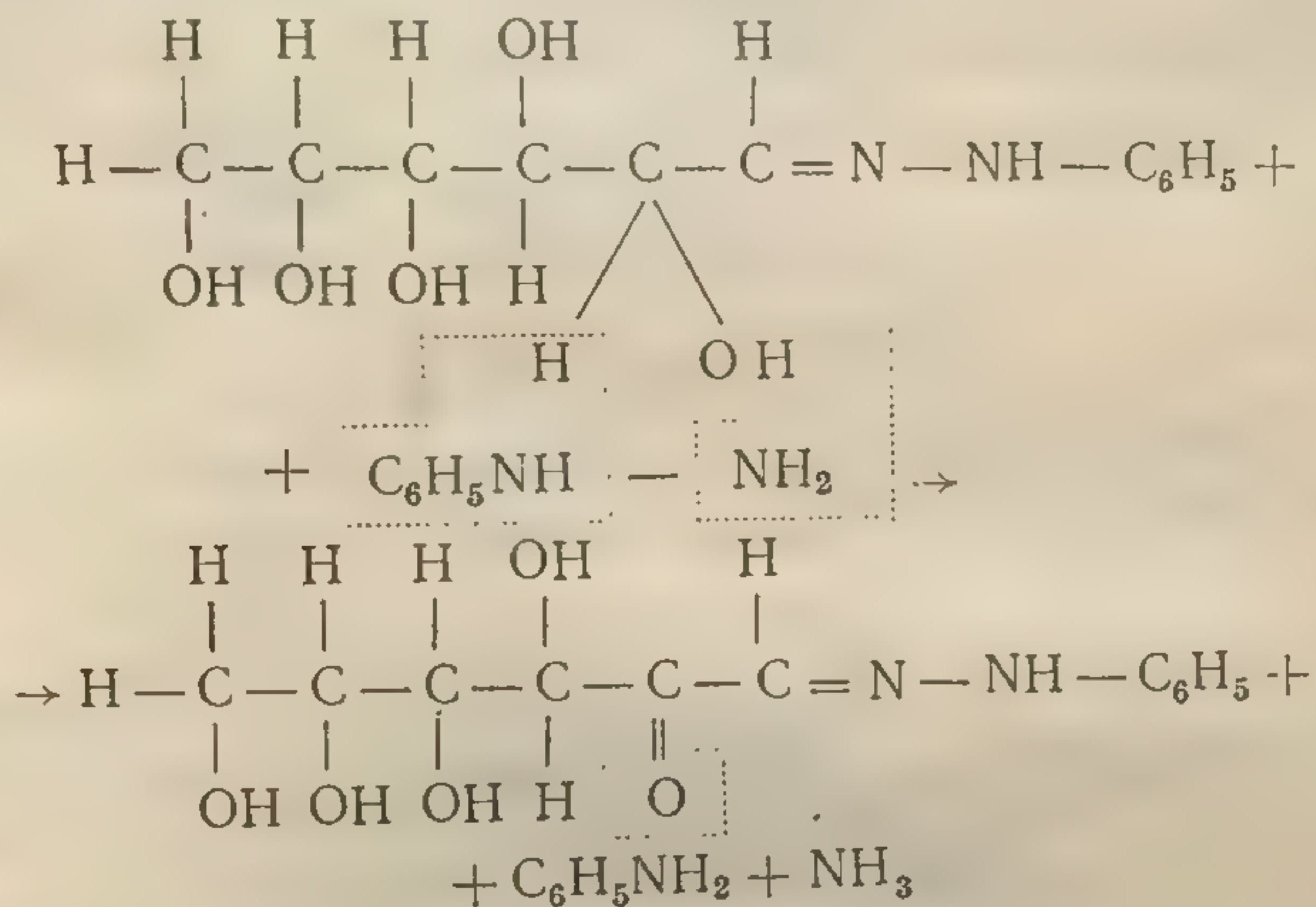
Но
лекул
глюкоз

1



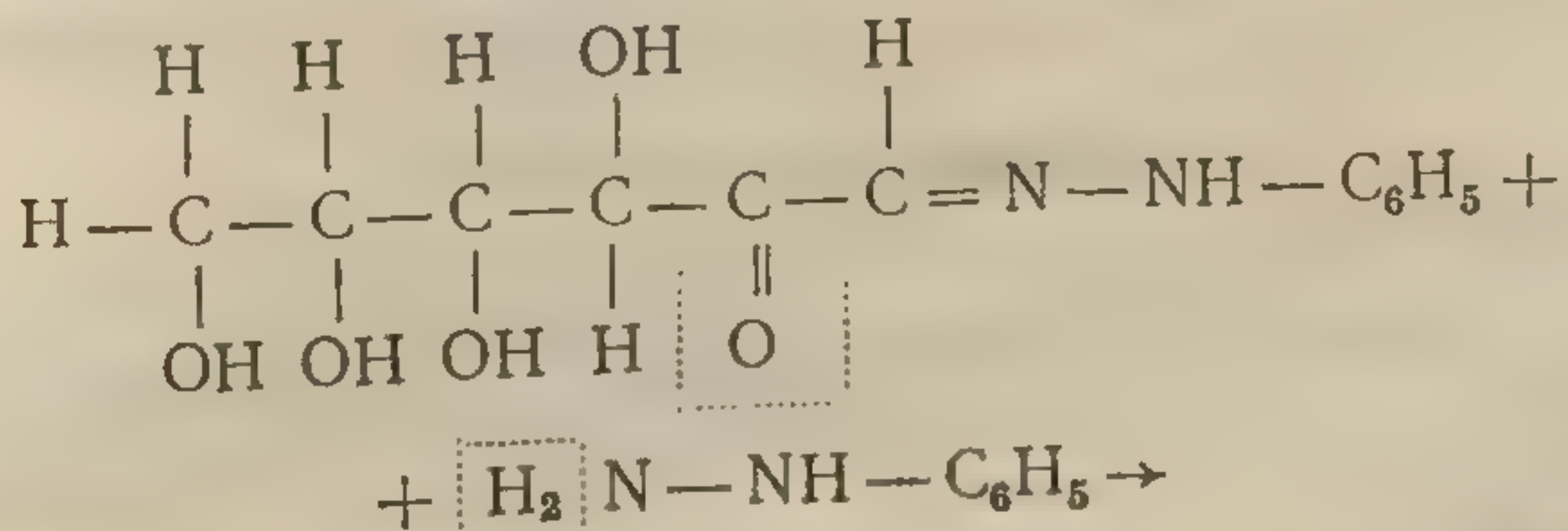
Фенилгидразон глюкозы

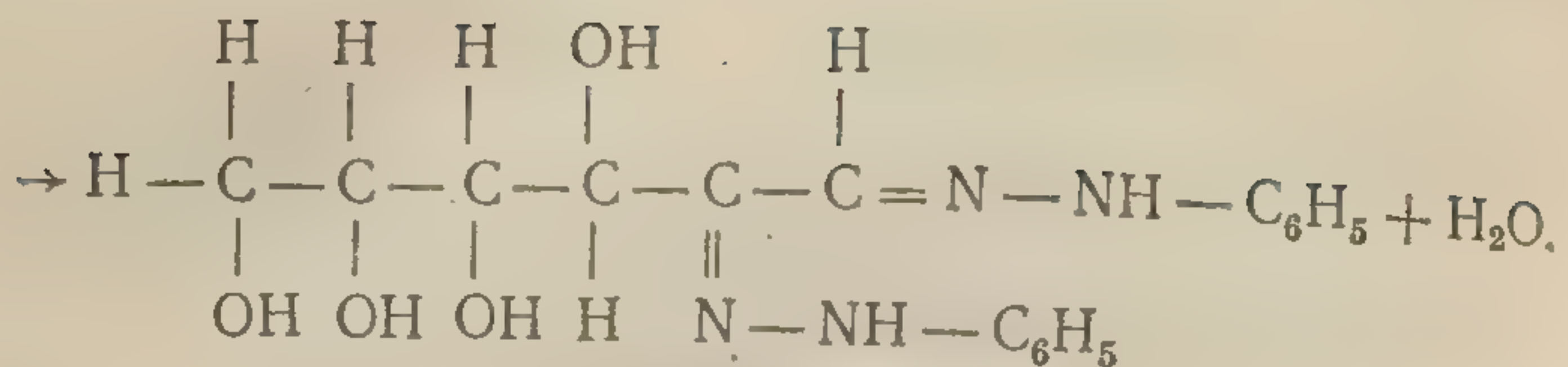
Далее фенилгидразин окисляет фенилгидразон, отнимая у него водород, и образует новую карбонильную группу у второго атома углерода глюкозы:



Анилин

Новая карбонильная группа реагирует еще с одной молекулой фенилгидразина и образует нерастворимый озазон глюкозы:





Оозон глюкозы

- П р и б о р ы.
1. Штатив с пробирками.
 2. Водяная баня.
 3. Стакан со льдом и водой.
 4. Микроскоп.
 5. Предметное стекло.
 6. Пипетка.

- Р е а к т и в ы.
1. Фенилгидразин солянокислый.
 2. Уксуснокислый натрий.
 3. Глюкоза, 0,5% раствор.

Х о д р а б о т ы

1. В пробирку вносят 0,1—0,15 г солянокислого фенилгидразина и 0,2—0,3 г уксуснокислого натрия.



Рис. 10. Кристаллы фенилглюкозона.

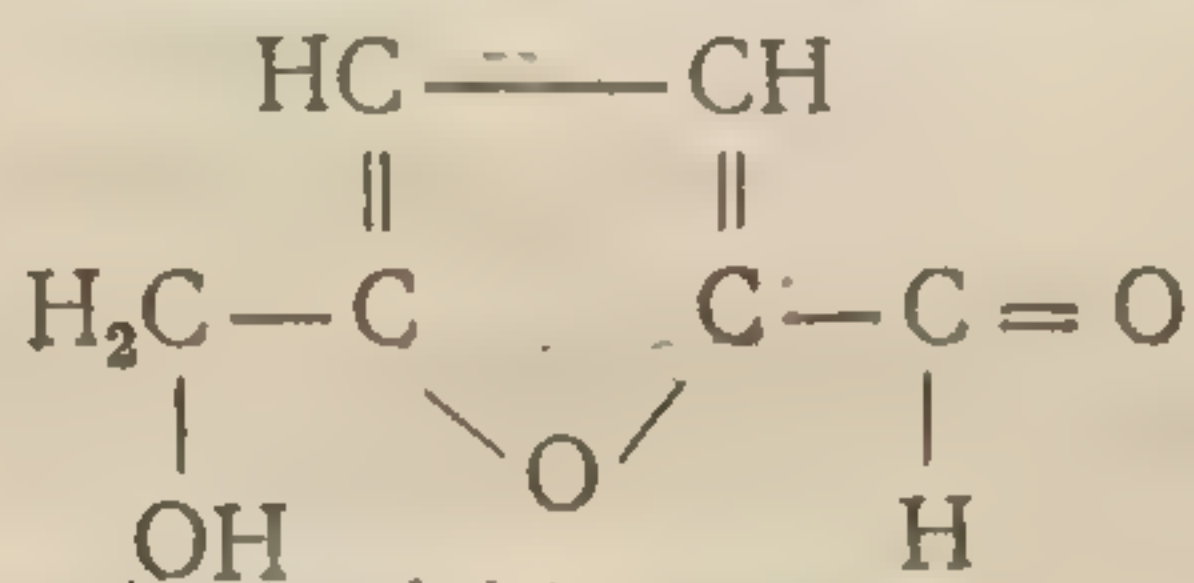
2. Приливают 1,5—2 мл раствора глюкозы и ставят в кипящую водяную баню на 30—40 минут, время от времени перемешивая содержимое пробирки встряхиванием.

3. Пробирку переносят из водяной бани в стакан со льдом. Выпадает кристаллический осадок озона глюкозы, который частично образуется еще в водяной бане.

Выпавший осадок наносят пипеткой на предметное стекло и рассматривают под микроскопом (см. рис. 10).

V. Реакция Селиванова на фруктозу

Фруктоза и другие кетогексозы как в свободном состоянии, так и отщепляясь из более сложных соединений (например, сахарозы), дают вишнево-красное окрашивание при нагревании с соляной кислотой и резорцином. Нередко при этом образуется также бурокрасный осадок. Получающаяся окраска зависит от реакции резорцина с оксиметилфурфуролом, образующимся при нагревании кетоз с кислотой.



Оксиметилфурфурол

Альдозы также могут образовывать оксиметилфурфурол при нагревании с кислотами, однако эта реакция с альдозами протекает много медленнее, что и обуславливает достаточную специфичность реакции Селиванова.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. 1. Фруктоза, 1% раствор.

2. Реактив Селиванова (приготовление см. стр. 331, п. 50).

Ход работы

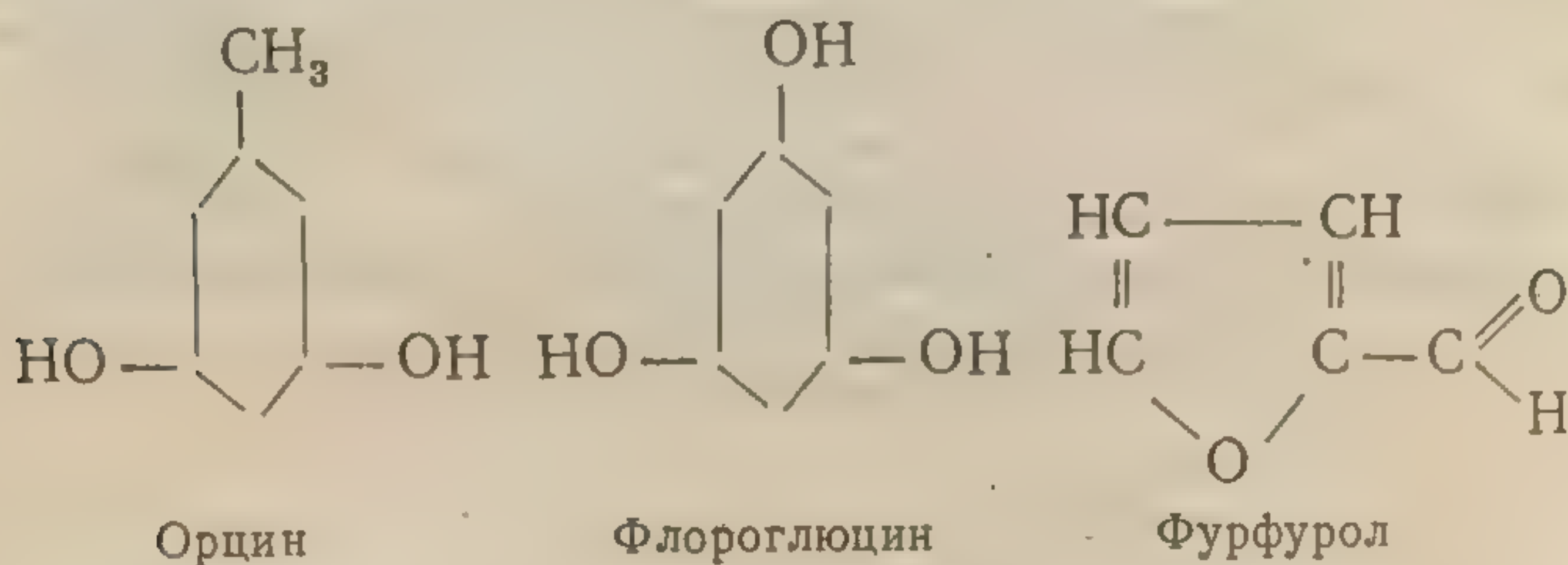
В пробирку наливают 1—2 мл реактива Селиванова. Добавляют 1—2 капли раствора фруктозы и нагревают до кипения. Наблюдают красное окрашивание.

VI. Реакции на пентозы

Пентозы, т. е. моносахариды с пятью атомами углерода, широко распространены в растительном мире. В животном организме пентозы встречаются главным образом в составе нуклеопротеидов (см. стр. 42) и некоторых фер-

ментов. При обильном приеме в пищу продуктов, богатых пентозами, последние выделяются с мочой (пентозурия). В этих случаях при клиническом анализе мочи важно отличить пентозурию от глюкозурии.

При кипячении с кислотами пентозы дают зеленое окрашивание с орцином и красное с флороглюцином. Реакция зависит от того, что пентозы в этих условиях отщепляют воду и образуют фурфурол. Последний легко может быть отогнан и обнаружен также по красному окрашиванию с анилином.



П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.

2. Пипетки.

3. Полоски фильтровальной бумаги.

Р е а к т и в ы. 1. Орциновый реактив (приготовление см. стр. 327, п. 29).

2. Флороглюцин, 0,2%. раствор в 30% соляной кислоте.

3. Анилин уксуснокислый (1 часть анилина с 2 частями ледяной уксусной кислоты).

4. Соляная кислота концентрированная.

5. Пентоза (арабиноза или ксилоза), 0,25% раствор.

Х о д р а б о т ы

А. Реакция с орцином

1. 1—2 мл орцинового реактива наливают в пробирку и нагревают до кипения.

2. Быстро добавляют 5—6 капель раствора пентозы. Через 2—3 минуты развивается зеленое окрашивание.

Б. Реакция с флороглюцином

1. В пробирку наливают 1—2 мл раствора флороглюцина и нагревают до кипения.

2. Быстро добавляют 5—6 капель раствора пентозы. Сейчас же появляется розовое окрашивание, переходящее затем в красное.

В. Реакция на обнаружение фурфурола

1. В пробирку наливают 1—2 мл раствора пентозы и добавляют равный объем концентрированной соляной кислоты.

2. Полоску фильтровальной бумаги смачивают уксуснокислым анилином.

3. Нагревают и кипятят содержимое пробирки, держа бумажку, смоченную уксуснокислым анилином, в парах.

Бумажка окрашивается в красный цвет вследствие реакции фурфурола с анилином.

ПЕРЕВАРИВАНИЕ КРАХМАЛА АМИЛАЗОЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОГО СОКА

Крахмал и некоторые другие полисахариды, попадающие в кишечный тракт с пищей, не успевают полностью расщепиться под действием амилазы слюны в полости рта и в желудке, где амилаза слюны некоторое время продолжает действовать (желудочный сок не содержит амилазы). Гидролиз полисахаридов в основном происходит в двенадцатиперстной кишке под действием амилазы поджелудочного сока. Получающаяся при этом мальтоза, наряду с другими дисахаридами, переваривается затем до моносахаридов под действием кишечного сока.

П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.
2. Термостат.
3. Термометр.

Р е а к т и в ы. 1. Крахмал, 0,1% раствор в воде, содержащей 0,3% хлористого натрия.
2. Вытяжка из поджелудочной железы или 0,2% раствор панкреатина (в 0,1% двууглекислой соде).
3. Желудочный сок или 0,1% раствор пепсина в 0,2% соляной кислоте (приготовление см. стр. 327, п. 30).

4. Едкий натр, 10% раствор.
5. Сернокислая медь, 5% раствор.
6. Соляная кислота, 10% раствор.
7. Раствор иода в иодистом калии (приготовление см. стр. 329, п. 39).

Ход работы

1. В три пробирки наливают приблизительно по 1 мл раствора крахмала.

2. В первую пробирку добавляют 2—3 мл вытяжки из поджелудочной железы или раствора панкреатина, во вторую — 2—3 мл желудочного сока или раствора пепсина и в третью — 2—3 мл желудочного сока или раствора пепсина, предварительно нейтрализованного едким натром.

3. Ставят все три пробирки в термостат при 37—40° на 1½—2 часа.

4. Проделывают с частью содержимого каждой пробирки реакцию на крахмал с раствором иода в иодистом калии. Перед прибавлением иода жидкость, отлитую из первой и третьей пробирок, подкисляют несколькими каплями соляной кислоты, так как, реагируя со щелочью, иод обесцвечивается.

Поскольку в первой пробирке происходит расщепление крахмала, то там синего окрашивания наблюдаться не будет, но возможно появление фиолетово-красного окрашивания (декстрины). Реакция с содержимым из второй и третьей пробирок будет положительной, т. е. наблюдается синее окрашивание.

5. Проделывают с содержимым каждой пробирки реакцию Троммера (стр. 131).

Отмечают положительную реакцию Троммера в пробирке с раствором панкреатина, где подействовала амилаза. В пробирках с ненейтрализованным и нейтрализованным желудочным соком реакция Троммера будет отрицательной, что указывает на отсутствие амилазы в желудочном соке.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРА В КРОВИ

Как уже указывалось, в норме кровь всегда содержит довольно постоянное количество сахара (глюкозы).

При некоторых заболеваниях, например, при диабете, наблюдается повышенное содержание сахара в крови (г и-

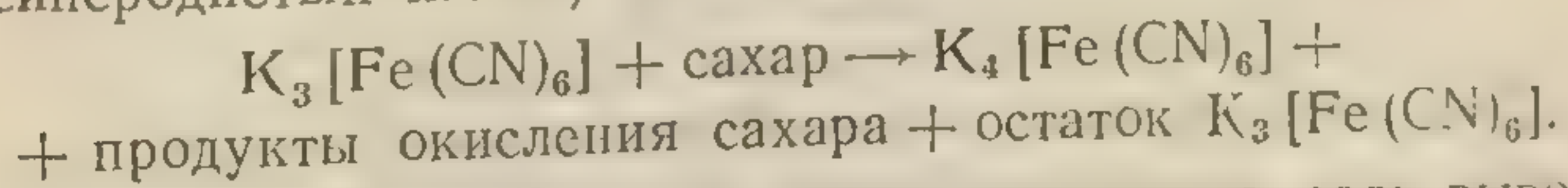
перглия). После принятия пищи, богатой углеводами, также имеет место повышение содержания глюкозы в крови (алиментарная гиперглия), которая, в отличие от патологической гипергликемии, непродолжительна.

Количественное определение сахара в крови играет большую роль в клинических анализах.

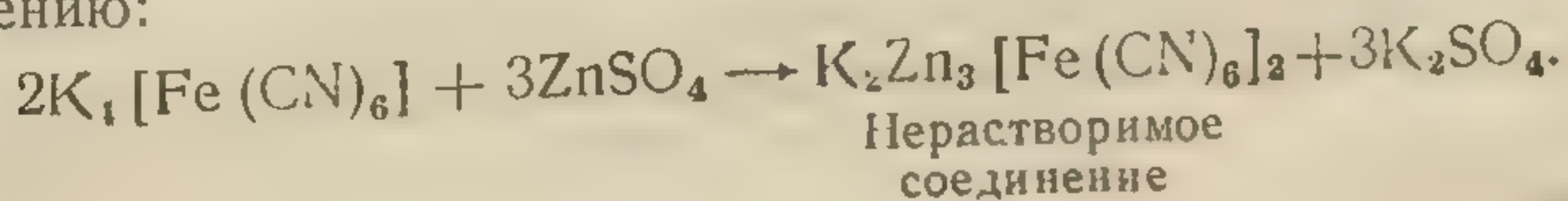
Методом Хагедорна-Иенсена в крови определяется не только глюкоза, но и некоторые другие восстанавливающие вещества (например, глутатион, мочева кислота, креатинин). Общая восстанавливающая способность крови, принимаемая при этом за «сахар» крови, колеблется в норме натошак, в пересчете на глюкозу, в пределах 80—120 мг%, т. е. 0,08—0,12 г в 100 мл крови. Собственно глюкозы в крови несколько меньше. То обстоятельство, что вместе с глюкозой определяются и другие восстанавливающие вещества крови, является недостатком метода, но не очень препятствует использованию его, так как глюкоза значительно преобладает над другими восстанавливающими веществами крови, и результаты определений в подавляющем большинстве случаев говорят о содержании в крови именно глюкозы.

Принцип метода заключается в следующем.

Исследуемую порцию крови освобождают от белков. Для этого на кровь действуют растворами сернокислого цинка и едкого натра и полученную смесь кипятят и отфильтровывают. К фильтрату, содержащему сахар, приливают определенное количество титрованного раствора $K_3[Fe(CN)_6]$ (красная кровяная соль, железосинеродистый калий). В щелочном растворе при нагревании эта соль частично (в зависимости от количества сахара) переходит в $K_4[Fe(CN)_6]$ (желтая кровяная соль, железисто-синеродистый калий) по схеме:



Далее образовавшаяся желтая кровяная соль выводится из реакции с помощью сернокислого цинка, с которым она образует нерастворимое соединение по уравнению:



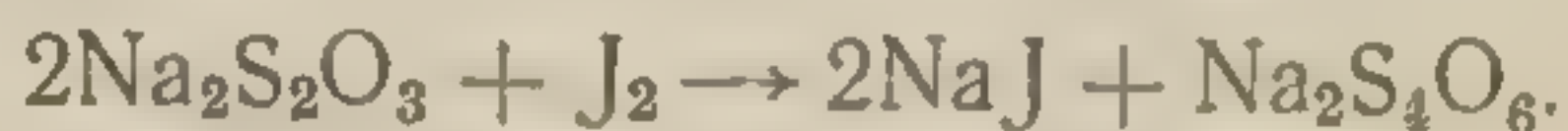
Благодаря этому $K_4[Fe(CN)_6]$ не может при производстве определения сахара перейти обратно в $K_3[Fe(CN)_6]$, что повлекло бы за собой искажение результатов определения.

Оставшееся (не использованное для окисления) количество $K_3[Fe(CN)_6]$ определяется иодометрически.

Красная кровяная соль выделяет в кислой среде эквивалентное количество свободного иода из иодистого калия:



а иод оттитровывается гипосульфитом:



Таким образом, если сахара в крови много, то остается мало неиспользованной $K_3[Fe(CN)_6]$ и, следовательно, мало выделяется свободного иода. Соответственно мало гипосульфита идет и на титрование этого иода. Отсюда легко понять, что между количеством сахара и количеством гипосульфита, израсходованного на титрование, имеется не прямая, а обратная зависимость.

Так как глюкоза дает при окислении различные продукты, причем степень окисления зависит от условий опыта (продолжительности нагревания, концентрации сахара и реактивов), то количество сахара не может быть рассчитано стехиометрически.

Концентрацию сахара в крови находят по результатам иодометрического титрования при помощи специальной таблицы, составленной эмпирически. При строгом соблюдении условий опыта этот способ дает достаточно точные результаты.

П р и б о р ы. 1. Микропипетка на 100 μ л (0,1 мл), сухая.

2. Штатив с пробирками.

3. Водяная баня со специальным вкладышем для стаканчиков.

4. Воронки диаметром 3—4 см, 2 шт.

5. Стаканчики (25 \times 100 мм) или колбочки, 2 шт.

6. Пипетки на 1, 2, 3 и 5 мл.

7. Микробюретка на 2 мл.

8. Игла для взятия крови.

9. Вата.
10. Вата, прокипяченная в дистиллированной воде, отжатая и затем высушенная (для фильтрования жидкости).
- Р е а к т и в ы.
1. Сернокислый цинк, 0,45% раствор.
 2. Едкий натр, 0,1 н. раствор.
 3. Железосинеродистый калий, щелочной раствор 0,005 н. (приготовление см. стр. 324, п. 17).
 4. Тройной хлор-цинк-иодистый раствор (приготовление см. стр. 332, п. 57).
 5. Уксусная кислота, 3% раствор.
 6. Крахмал, 1% раствор в насыщенном растворе хлористого натрия.
 7. Гипосульфит, 0,005 н. раствор (проверка см. стр. 323, п. 11).
 8. Этиловый спирт.
 9. Диэтиловый эфир.

Х о д р а б о т ы

1. Наливают в две пробирки по 5 мл раствора сернокислого цинка и по 1 мл раствора едкого натра. При этом образуется коллоидный раствор гидрата окиси цинка, который в дальнейшем участвует в осаждении белков крови.

2. Берут из пальца (см. стр. 78) или из уха кролика микропипеткой точно 0,1 мл крови, следя за тем, чтобы в пипетку не попадали пузырьки воздуха. Обтирают кончик микропипетки ватой от приставшей снаружи крови и выдувают ее в одну из пробирок с гидратом окиси цинка. Микропипетку три раза промывают содержимым пробирки, осторожно набирая и обратно выпуская жидкость.

Содержимое второй пробирки служит в качестве контрольного («слепого») опыта. Слепой опыт необходим потому, что реактивы обычно содержат некоторое количество восстанавливающих веществ и отсутствие контроля на реактивы может внести существенную ошибку в результаты определения.

3. Помещают обе пробирки в кипящую водяную баню на 3 минуты.

4. Вставляют в стаканчики (или колбочки) воронки, в которые вложены слегка утрамбованные маленькие комочки ваты.

5. Смачивают ватные фильтры несколькими каплями дистиллированной воды и отфильтровывают содержимое пробирок, сливая его на фильтр по стеклянной палочке.

6. Промывают дважды каждую пробирку, беря по 3 мл дистиллированной воды; промывные воды сливают через ватные фильтры и дают им хорошо стечь в соответствующие стаканчики или колбочки.

7. Прибавляют в каждый стаканчик точно по 2 мл титрованного раствора красной кровяной соли.

8. Помещают стаканчики ровно на 15 минут в кипящую водяную баню.

9. Охлаждают стаканчики и приливают в каждый из них по 3 мл тройного раствора и по 2 мл раствора уксусной кислоты. Добавляют по 2 капли раствора крахмала и на белом фоне оттитровывают выделившийся иод в каждом стаканчике из микробюретки гипосульфитом до исчезновения синего окрашивания.

10. Производят соответствующие расчеты на основании табл. 3.

Пользование таблицей и расчеты будут ясны из следующего конкретного примера.

Допустим, на титрование содержимого стаканчика с кровью пошло 1,43 мл гипосульфита. По табл. 3 в первом вертикальном столбце находим цифру 1,4 и в верхнем горизонтальном — 0,03. На месте пересечения — соответственно 0,101. Далее, допустим, на титрование содержимого контрольного стаканчика пошло 1,97 мл гипосульфита, что по таблице соответствует 0,005. Из количества сахара, найденного для крови (0,101), вычитаем количество «сахара», которое соответствует восстанавливающему действию реактивов (0,005), и получаем 0,096, таким образом, в 0,1 мл исследуемой крови содержится 0,096 мг сахара, а в 100 мл крови соответственно — 96 мг сахара.

Разумеется, что если гипосульфит не точно 0,005 нормальный, то количество его, пошедшее на титрование, предварительно пересчитывается путем умножения на «поправку».

* КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРА В КРОВИ ПРИ САХАРНОЙ НАГРУЗКЕ

Клиническое значение определения количества сахара в крови очень велико, особенно если исследовать на содержание сахара одновременно и кровь, и мочу (стр. 283).

Таблица 3

Содержание сахара в крови при определении по Хагедорну-Иенсену

Гипосульфит в мл	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264	0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,141	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,097	0,095	0,093	0,092	0,090
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,020	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,007	0,005	0,003	0,002

Кроме того, количественное определение сахара в крови имеет очень большое значение, если вести его при так называемой сахарной нагрузке. Последняя является пробой на функцию печени. Эта проба заключается в том, что кровь больного вначале исследуют (натощак) на содержание сахара, затем больному дают выпить раствор виноградного сахара из расчета 1,5—1,75 г

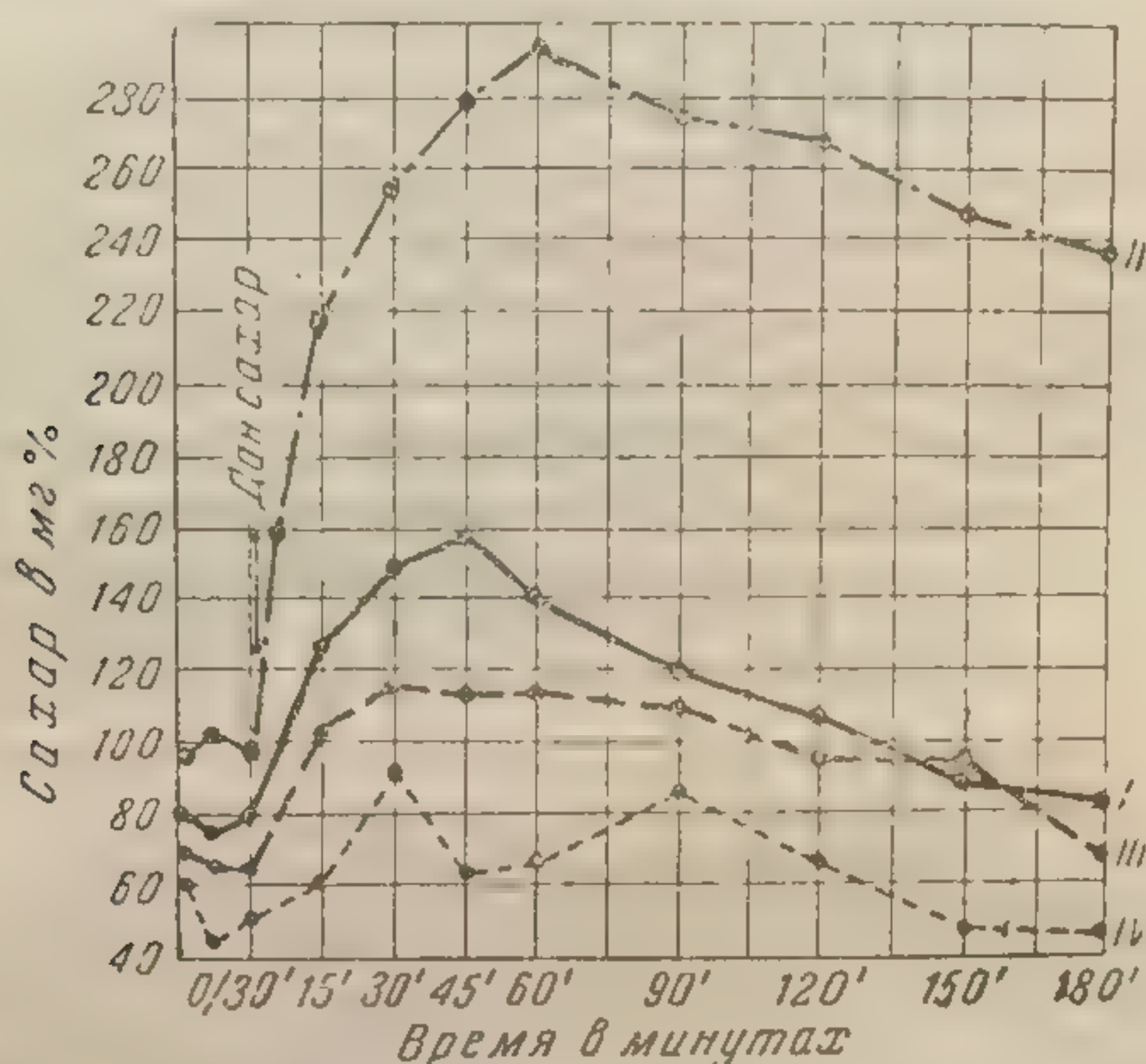


Рис. 11. Кривые содержания сахара в крови.
I — нормальная кривая; II — диабетическая кривая;
III — низкая кривая; IV — гипогликемическая кривая
(по А. М. Петрунькиной и М. Л. Петрунькину).

на 1 кг веса, но не свыше 100 г глюкозы и производят определение сахара в крови через 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 и 180 минут после приема сахара. Результаты исследования изображают в виде кривой и по ее виду, совместно с другими клиническими данными, судят о характере заболевания. В качестве примера на рис. 11 изображены четыре кривые, выражающие содержание сахара в крови человека после сахарной нагрузки.

ВЛИЯНИЕ ИНСУЛИНА НА КОЛИЧЕСТВО САХАРА В КРОВИ

Инсулин является одним из гормонов, регулирующих углеводный обмен. Инсулин вырабатывается островками Лангерганса поджелудочной железы и представляет собой ве-

щество белкового характера. Введенный под кожу или внутривенно (но не per os), инсулин вызывает уменьшение количества сахара в крови. Это понижение имеет место вследствие того, что гормон стимулирует как синтез гликогена из глюкозы в печени и мышцах, так и распад глюкозы в тканях. Благодаря этому действию инсулин широко применяется при лечении страдающих сахарной болезнью¹.

- П р и б о р ы.
1. Ножницы для выстригания шерсти у кролика.
 2. Шприц на 2—5 мл для введения инсулина.
 3. Шприц на 10 мл для введения раствора глюкозы.
 4. Микропипетки на 0,1 мл, 2 шт.
 5. Маленький стаканчик для разведения инсулина.
 6. Пипетка на 1 мл с делениями.
 7. Пипетка на 5 мл с делениями.

Кроме того, необходимы все остальные приборы для определения сахара в крови (стр. 140).

- Р е а к т и в ы.
1. Ксилол.
 2. Инсулин, продажный препарат (40 единиц в 1 мл).
 3. Глюкоза, 40% раствор.

Кроме того, необходимы все реактивы для определения сахара в крови (стр. 141).

Х о д р а б о т ы

1. Кролика, предварительно голодавшего в продолжение суток, взвешивают.

2. Вычисляют количество инсулина, которое необходимо ввести кролику, исходя из расчета 1,5 единицы на 1 кг веса².

¹ Путь получения активных препаратов из поджелудочной железы и возможность применения их для борьбы с диабетом были впервые открыты Л. В. Соболевым в 1902 г.

² Клинической единицей считают $\frac{1}{2}$ такого количества инсулина, которое вызывает у голодавшего кролика весом в 2 кг конвульсии и смерть через 5 часов после введения. Таким образом, доза в 1,5 единицы на 1 кг веса кролика приводит к смертельному шоку, если своевременно не ввести животному глюкозу (см. ниже). Такая большая доза применяется для того, чтобы достаточно быстро вызвать гипогликемию.

Предположим, что кролик весит 2 кг. Для того чтобы за 1 час произвести надлежащий эффект, ему необходимо ввести $1,5 \times 2 = 3$ единицы инсулина. Так как продажный препарат инсулина содержит 40 единиц в 1 мл, то, следовательно:

$$\begin{array}{r} 1 \text{ ————— } 40 \\ x \text{ ————— } 3, \end{array}$$

$$\text{откуда } x = \frac{3}{40} = 0,075,$$

т. е. кролику необходимо ввести 0,075 мл препарата инсулина. Так как такое количество инсулина набирать в шприц и вводить под кожу неудобно, то поступают следующим образом.

Отмеривают 0,15 мл инсулина (т. е. вдвое больше), наливают его в стаканчик, вливают туда 3,85 мл предварительно прокипяченной и охлажденной дистиллированной воды и жидкость перемешивают. Получается 4 мл раствора инсулина, из которого в дальнейшем кролику следует ввести только 2 мл¹.

3. Наливают в две пробирки (опытную и контрольную) по 5 мл раствора сернокислого цинка и по 1 мл раствора едкого натра.

4. Протирают ухо кролика ватой, смоченной ксилолом; смывают ксилол теплой водой, обтирают ухо сухой ватой, делают укол в ушную вену и набирают в сухую микропипетку 0,1 мл крови.

5. Обтирают кончик микропипетки от приставшей снаружи крови и быстро выдувают кровь в одну из пробирок.

6. Вводят кролику под кожу 2 мл заранее приготовленного раствора инсулина и отмечают время введения.

7. Продолжают и заканчивают определение сахара в крови, взятой до введения инсулина² (стр. 141).

8. Закончив определение, вновь наливают в две чистые пробирки по 5 мл раствора сернокислого цинка и по 1 мл раствора едкого натра.

¹ В продаже имеется также препарат инсулина, содержащий 20 клинических единиц в 1 мл. При пользовании таким препаратом расчеты следует производить, учитывая это обстоятельство.

² Пробирки с отмеренным количеством крови могут стоять несколько часов без заметного влияния на результаты определения, так как гидрат окиси цинка исключает возможность гликолиза.

9. По прошествии часа с момента введения кролику инсулина опять берут из ушной вены 0,1 мл крови и выпускают ее в пробирку.

10. Вводят кролику под кожу 10 мл раствора глюкозы для повышения содержания сахара в крови и предотвращения инсулинового шока.

11. Продолжают и заканчивают определение сахара в крови, взятой через 1 час после введения инсулина.

Сравнивая содержание сахара в крови до и после введения инсулина, отмечают резкое снижение сахара (гипогликемия) под влиянием инсулина.

ВЛИЯНИЕ АДРЕНАЛИНА НА КОЛИЧЕСТВО САХАРА В КРОВИ

Адреналин¹ является гормоном мозгового вещества надпочечников и представляет собой метилминноэтанолпирокатехин (см. стр. 104).

Адреналин влияет на углеводный обмен, способствуя распаду гликогена в печени до глюкозы. Благодаря этому при введении адреналина наступает гипергликемия и глюкозурия, т. е. эффект, противоположный действию инсулина.

- Приборы.
1. Ножницы для подстригания шерсти у кролика.
 2. Шприц на 2—5 мл для введения адреналина.
 3. Микропипетки на 0,1 мл, 2 шт.
 4. Маленький стаканчик для разведения адреналина.
 5. Пипетка на 5 мл с делениями.

Кроме того, необходимы все остальные приборы для определения сахара в крови (стр. 140).

- Реактивы.
1. Ксилол.
 2. Адреналин, продажный препарат (1 : 1 000).
 3. Хлористый натрий, 0,9% раствор.

Кроме того, необходимы все реактивы для определения сахара в крови (стр. 141).

¹ Роль адреналина и его производных в передаче нервного возбуждения изучалась А. М. Утевским.

Ход работы

1. Кролика, предварительно голодавшего в продолжение суток, взвешивают.

2. Вычисляют количество адреналина, которое необходимо ввести кролику, исходя из расчета 0,37 мл продажного (1 : 1 000) адреналина на 1 кг веса.

Так как обычно количество адреналина получается слишком малым, то раствор адреналина предварительно разводят в стаканчике физиологическим раствором (0,9% NaCl) с таким расчетом, чтобы ввести кролику 2 мл жидкости, в которых содержалось бы требуемое количество адреналина.

3. Наливают в две пробирки по 5 мл раствора сернокислого цинка и по 1 мл раствора едкого натра.

4. Берут из ушной вены кролика 0,1 мл крови и выпускают ее в одну из пробирок с сернокислым цинком и щелочью.

5. Вводят кролику под кожу 2 мл заранее приготовленного раствора адреналина (п. 2) и замечают время введения.

6. Наливают в две новые пробирки по 5 мл раствора сернокислого цинка и по 1 мл раствора едкого натра.

7. Через 30 минут после введения кролику адреналина вновь берут из ушной вены 0,1 мл крови и переносят ее в одну из пробирок (п. 6) с реактивами для определения сахара.

8. Продолжают и заканчивают определение сахара в крови, взятой как до введения адреналина, так и через 30 минут после его введения.

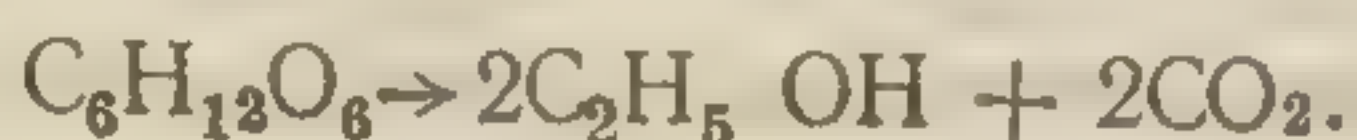
Сравнивая цифры содержания сахара в крови до и после введения адреналина, отмечают резкое повышение содержания сахара (гипергликемия) под влиянием адреналина.

ПРОБА НА БРОЖЕНИЕ

Как упоминалось выше, некоторые моносахариды под влиянием ферментов различных микроорганизмов подвергаются процессам распада, известным под названием брожения. Брожение бывает разных типов: спиртовое, молочнокислое, маслянокислое, уксуснокислое, ацетоновое и т. п.

Процессы брожения сахаров имеют большое технологическое значение в виноделии, пивоварении, производстве уксуса и т. п.

Под действием обыкновенных дрожжей глюкоза распадается на винный спирт и углекислый газ по схеме:



К спиртовому брожению способны только гексозы (а также триозы и ноозы). Другие моносахариды (например, пентозы) не бродят. Кроме того, различные конфигурации моносахаридов отражаются на способности их к брожению, и из двух оптических изомеров, например, гексоз, легче бродит тот изомер, который встречается в природе (например, d-глюкоза).

Для качественной пробы на брожение обычно пользуются специальными бродильными трубками (рис. 12), куда помещают исследуемый раствор и свежие дрожжи. Образующийся в результате брожения углекислый газ накапливается в трубке и узнается по поглощению его щелочью. Присутствие в трубке этилового спирта обнаруживается с помощью реакции получения иодоформа:

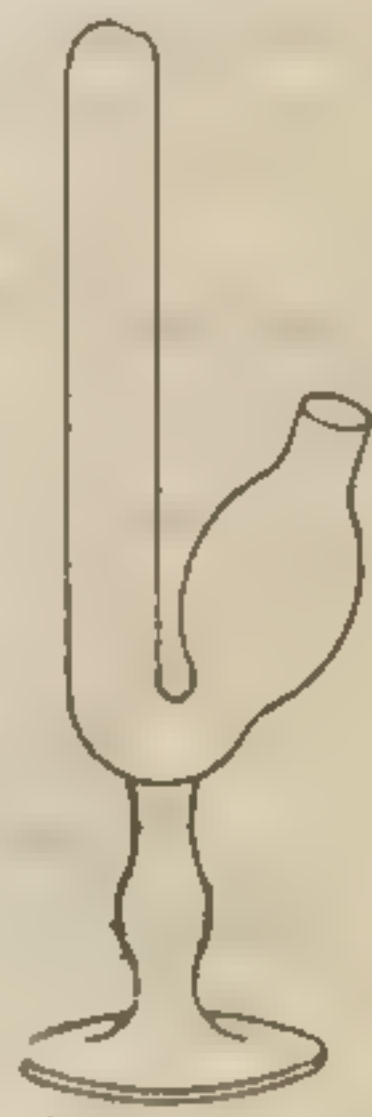


Рис. 12.
Бродильная трубка.



П р и б о р ы. 1. Две бродильные трубки.

2. Ступка с пестиком.

3. Два стакана.

4. Мерный цилиндр.

5. Термостат.

6. Термометр.

7. Штатив с пробирками

8. Небольшая воронка.

Р е а к т и в ы. 1. Свежие дрожжи.

2. Глюкоза, 5% раствор.

3. Виннокаменная кислота, 1% раствор.

4. Едкий натр, 10% раствор.

5. Раствор иода в иодистом калии (приготовление см. стр. 329, п. 39).

Ход работы

1. 1 г дрожжей растирают в ступке с 5 мл дистиллированной воды и полученную массу смывают в стакан 30 мл дистиллированной воды.

2. Тщательно перемешивают содержимое стакана и так как брожение лучше всего идет в слабокислой среде, добавляют в него около 1 мл раствора виннокаменной кислоты (до кислой реакции на лакмус). Благодаря добавлению слабой органической (виннокаменной) кислоты реакция среды не сдвигается слишком сильно в кислую сторону, как это было бы от минеральной кислоты, и устанавливается при $\text{pH} = 5-6$.

3. Наливают содержимое стакана в трубку для брожения таким образом, чтобы закрытое колено трубки было заполнено, а в широкой части трубки имелось некоторое количество жидкости. Заполненная таким образом трубка будет служить контролем, так как сами дрожжи могут содержать в себе некоторое количество сбраживаемых сахаров.

4. Далее 1 г дрожжей растирают в ступке с 5 мл исследуемого раствора глюкозы и полученную массу смывают в стакан 30 мл того же раствора глюкозы.

5. Тщательно перемешивают содержимое стакана и добавляют в него раствора виннокаменной кислоты (до кислой реакции на лакмус).

6. Наливают описанным выше способом содержимое стакана в другую трубку для брожения.

7. Ставят обе наполненные трубки в термостат при $30-35^\circ$ на 1—3 часа (в зависимости от активности дрожжей).

8. Вынимают обе трубки для брожения из термостата, и если дрожжи активны и сами не содержат сбраживаемых сахаров, то наблюдают отсутствие образования газа (или появление ничтожного количества газа) в закрытом колене первой трубки и накопление газа в закрытом колене второй трубки (с глюкозой).

9. Для того чтобы убедиться в том, что газ, образовавшийся во второй трубке, представляет собой CO_2 , в широкую часть трубки для брожения осторожно прибавляют раствор едкого натра до края, плотно закрывают отверстие трубки мякотью большого пальца и трубку несколько раз перевертывают. Углекислый газ поглощается щелочью, образуется вакуум, и мякоть пальца присасывается к отверстию прибора.

10. Для обнаружения этилового спирта (во второй трубке) из бродильной трубки отфильтровывают в пробирку небольшое количество (3—4 мл) жидкости. К фильтрату добавляют несколько капель раствора иода до появления желтого окрашивания и слегка подогревают. Через некоторое время ощущается характерный запах иодоформа.

Если жидкость не имеет щелочной реакции (от добавления щелочи при обнаружении CO_2), то до прибавления иода к фильтрату добавляют несколько капель раствора NaOH .

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФАТА В ПРОЦЕССЕ БРОЖЕНИЯ¹

В процессе брожения, так же как и гликолиза, распад углеводов идет через фосфорные эфиры гексоз, триоз и другие фосфорилированные промежуточные продукты. За счет энергии, освобождаемой при превращениях этих продуктов, например, при окислении дифосфоглицеринового альдегида, отщепляющийся остаток фосфорной кислоты переносится на адениловую систему, образуя богатые энергией связи аденозинтрифосфорной кислоты.

Вследствие фосфорилирования происходит связывание неорганического фосфата и концентрация последнего понижается.

Количество фосфата определяют колориметрически по реакции образования комплексной фосфорномолибденовой кислоты и восстановления ее в молибденовую синь (см. стр. 249). Для того чтобы убедиться в потреблении фосфата при брожении, достаточно сравнения развивающейся окраски на глаз, и колориметрирование можно не производить.

- Приборы.
1. Штатив с пробирками.
 2. Ступка с пестиком.
 3. Водяная баня.
 4. Воронки со складчатыми фильтрами— 3 шт.
 5. Пипетки на 1 мл, 3 шт.
 6. Пипетка на 5 мл.

¹ Это занятие разработано С. И. Пехтеревой на кафедре биологической химии I Московского ордена Ленина медицинского института.

7. Бюретки, 2 шт.
8. Пипетка на 0,5 мл или 1 мл с делениями.
9. Мерные колбочки на 100 мл, 3 шт.

Реактивы. 1. Раствор, содержащий 60 г фосфорнокислого натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) и 20 г фосфорнокислого калия (KH_2PO_4) в 1 л.

2. Дрожжи пивные, нижнего брожения.
3. Сахароза.
4. Трихлоруксусная кислота, 3% раствор.
5. Молибденовокислый аммоний, 2,5% раствор в 5 н. серной кислоте (приготовление см. стр. 325, п. 21).
6. Эйконоген (1,2,4-аминонафтолсульфоновокислый натрий), 0,25% раствор, содержащий сульфит и бисульфит (приготовление см. стр. 334, п. 69), или аскорбиновая кислота, 0,5% раствор.

Ход работы

1. Около 1 г дрожжей растирают в ступке с 1 г сахарозы и 5 мл воды, добавляют 5 мл раствора фосфорнокислых солей и тщательно перемешивают.

2. 1 мл полученной взвеси (проба № 1) переносят пипеткой в пробирку и осаждают 3 мл трихлоруксусной кислоты из бюретки.

3. Остальную взвесь переносят в пробирку, помещают в водяную баню при 37° и замечают время.

4. Через 30 минут, а затем еще через 30 минут отмеривают по 1 мл взвеси (пробы № 2 и 3) и осаждают каждую пробу 3 мл трихлоруксусной кислоты.

5. Отфильтровывают каждую пробу через складчатый фильтр, отмеривают в мерные колбочки по 1 мл фильтрата и доливают из бюретки по 10 мл воды.

6. Добавляют по 1 мл раствора молибденовокислого аммония, по 0,5 мл раствора эйконогена или аскорбиновой кислоты, доводят водой до метки, перемешивают и оставляют на 15 минут. Развивается синее окрашивание. Интенсивность окраски тем слабее, чем позже взята проба, что указывает на уменьшение концентрации

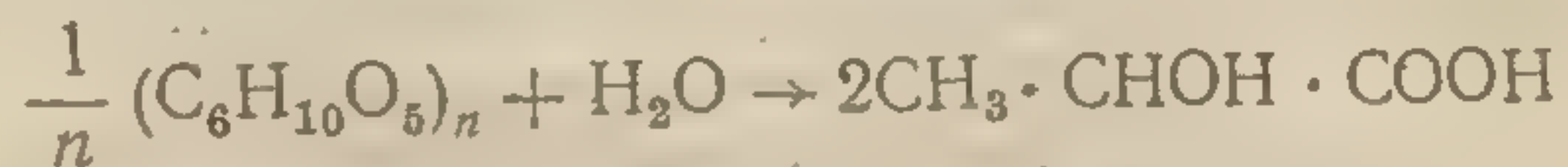
неорганического фосфата по мере развития процесса брожения.

Концентрация фосфата может быть определена количественно колориметрически (см. стр. 249).

ГЛИКОЛИЗ

Гликолизом называют анаэробный распад углеводов в тканях с образованием молочной кислоты. Процесс гликолиза подробно изучен и включает в себя ряд отдельных реакций. В мышцах главным субстратом гликолиза является гликоген, который подвергается сначала фосфоролизу (распаду с присоединением фосфорной кислоты) и далее, через фосфорные эфиры гексоз, триоз и через пировиноградную кислоту распадается до молочной кислоты. Вследствие этого процесс этот часто называют также гликогенолизом.

Гликолиз включает в себя окислительно-восстановительные реакции, но в целом является анаэробным процессом:



Гликоген

Молочная кислота

Гликолиз — важнейший процесс промежуточного обмена углеводов, дающий тканям энергию. В присутствии кислорода воздуха гликолиз тормозится и основным процессом в тканях является дыхание (эффект Пастера).

Удобным объектом для демонстрации гликолиза может служить мышечная кашица или мышечный экстракт. Экстракт не обнаруживает пастеровского эффекта, вследствие чего можно работать в аэробных условиях. В случае кашицы необходима изоляция от кислорода воздуха (вазелиновое масло).

Гликолиз можно наблюдать, переводя образующуюся молочную кислоту в уксусный альдегид и обнаруживая его по реакции с вератролом или же по накоплению в бродильной трубке CO_2 , вытесненного из бикарбоната образовавшейся молочной кислотой. В опыте дорогостоящий гликоген может быть заменен крахмалом.

1. Гликолиз с мышечной кашицей¹

Образующуюся при гликолизе молочную кислоту после удаления белков и углеводов превращают горячей серной кислотой в уксусный альдегид. Последний обнаруживают по цветной реакции с вератролом (красное окрашивание).

- П р и б о р ы.
1. Штатив с пробирками.
 2. Пипетка на 10 мл с делениями.
 3. Воронки маленькие, 2 шт.
 4. Чашка со льдом.
 5. Баня водяная.
 6. Термостат с термометром.
 7. Технические весы с разновесом.
 8. Маленький мерный цилиндр.
 9. Бюретки, 3 шт.

- Р е а к т и в ы.
1. Фосфатный буфер $pH=8,0$ (приготовление см. стр. 333, п. 65).
 2. Гликоген (приготовление см. стр. 323, п. 12) или крахмал, 0,5% раствор.
 3. Свежая мышечная кашица (приготовление см. стр. 326, п. 24).
 4. Метафосфорная кислота, 15% раствор.
 5. Вазелиновое масло.
 6. Гидрат окиси кальция.
 7. Сернокислая медь, насыщенный раствор.
 8. Серная кислота, концентрированная.
 9. Вератрол (диметиловый эфир пирокатехина).

Х о д р а б о т ы

1. В две пробирки наливают по 3 мл фосфатного буфера.
2. В первую пробирку прибавляют 1 мл дистиллированной воды, во вторую—1 мл раствора гликогена или крахмала.
3. В первую пробирку, которая будет служить контрольной пробой на содержащуюся в мышечной кашице молоч-

¹ Настоящая работа занимает в среднем около 5 часов. Если эту работу не представляется возможным окончить в одно занятие, она может быть прервана после п. 7 и закончена на следующем занятии.

ную кислоту, добавляют 2 мл раствора метафосфорной кислоты (для осаждения белков и прекращения ферментативных процессов).

4. В каждую пробирку добавляют по 0,5 г свежеприготовленной мышечной кашицы и заливают слоем (2—3 мм) вазелинового масла.

5. Обе пробирки ставят в термостат на 2 часа при 37°.

6. Через 2 часа осаждают белки во второй пробирке 2 мл раствора метафосфорной кислоты при помешивании.

7. Отфильтровывают содержимое каждой пробирки.

8. Отмеривают по 4 мл безбелкового фильтрата каждой пробы и осаждают углеводы добавлением в каждую пробу по 0,35 г гидрата окиси кальция и 1 мл насыщенного раствора сернокислой меди. Хорошо перемешивают стеклянной палочкой содержимое каждой пробирки и оставляют на 30 минут, время от времени перемешивая содержимое.

9. Отфильтровывают образовавшийся осадок.

10. Из фильтрата каждой пробы берут в две пробирки по 0,5 мл и охлаждают во льду.

11. Осторожно, по каплям, из цилиндрика приливают по 1,5 мл концентрированной серной кислоты в каждую пробирку.

12. Ставят обе пробирки в кипящую водяную баню на 4 минуты.

13. Через 4 минуты пробирки перемещают в лед на 2 минуты.

14. Прибавляют в каждую пробу по 4—5 капель вератрола, осторожно встряхивают и оставляют стоять на 20 минут¹.

Во второй пробе (где происходил гликолиз) развивается интенсивное красное окрашивание, указывающее на образование молочной кислоты.

В первой пробе наблюдается менее интенсивное окрашивание за счет предобразованной в мышцах молочной кислоты.

¹ Вертрол затвердевает при 15°, поэтому если вертрол закристаллизовался, его следует предварительно подогреть до расплавления.

II. Гликолиз с мышечным экстрактом

С мышечным экстрактом гликолиз можно вести в аэробных условиях. Процесс обнаруживается по накоплению углекислого газа, вытесненного молочной кислотой из бикарбоната. Молочная кислота может быть обнаружена также при помощи описанной выше реакции с вератролом.

П р и б о р ы. 1. Бродильные трубки (рис. 12, стр. 149)— 3 штуки.

2. Пипетка на 10 мл с делениями.
3. Пипетка на 2 мл.
4. Термостат с термометром.
5. Штатив с пробирками.
6. Воронки маленькие, 3 шт
7. Чашка со льдом.
8. Водяная баня.
9. Технические весы с разновесом.
10. Маленький мерный цилиндр.
11. Бюретки, 3 шт.

Р е а к т и в ы. 1. Свежий мышечный экстракт (приготовление см. стр. 326, п. 25).

2. Кислый углекислый натрий, 0,4 м. раствор.
3. Крахмал, 4% раствор.
4. Едкий натр, 10% раствор.
5. Тимол, мелко истолченный.
6. Метафосфорная кислота, 15% раствор.
7. Гидрат окиси кальция.
8. Сернокислая медь, насыщенный раствор.
9. Серная кислота, концентрированная.
10. Вератрол.

Х о д р а б о т ы

1. В две бродильные трубки наливают по 8 мл свежего мышечного экстракта и в третью трубку — 8 мл предварительно прокипяченного мышечного экстракта.

2. Во все три бродильные трубки добавляют по 2 мл раствора бикарбоната.

3. Добавляют в первую бродильную трубку 2 мл воды (контроль), во вторую и в третью — по 2 мл раствора крахмала.

4. Во все три трубки добавляют приблизительно по 20 мг мелко истолченного тимола для предохранения от развития микроорганизмов. Перемешивают содержимое каждой бродильной трубки и ставят все трубки в термостат при 37° на 1—2 суток.

5. Через 1—2 суток вынимают трубки. Отмечают накопление газа во второй трубке и отсутствие накопления газа или минимальное накопление его в первой (контрольной) и в третьей (с прокипяченным мышечным экстрактом) трубках.

6. Убеждаются в том, что выделившийся во второй трубке газ есть CO_2 (по поглощению его едким натром, стр. 150, п. 9).

7. Для обнаружения молочной кислоты по реакции с вератролом отмеривают в три пробирки из каждой бродильной трубки по 4 мл жидкости. Добавляют в каждую пробирку по 2 мл раствора метафосфорной кислоты. Далее определение ведут точно так же, как и в вышеописанной пробе с мышечной кашицей (стр. 154, п. 8—14).

ОБМЕН БЕЛКОВ

Белки являются необходимой составной частью пищи человека и животных.

Значительные количества белков содержатся в ряде пищевых продуктов животного происхождения (мясо, яйца, творог, сыр и т. п.) и в некоторых продуктах растительного происхождения (горох, фасоль, бобы, соя и т. п.). Злаки содержат меньше белка; однако, так как хлеб обычно занимает большое место в питании, он является одним из важнейших источников пищевого белка. Небольшие количества белка содержатся почти во всех пищевых продуктах.

В желудке белки перевариваются пепсином до высокомолекулярных продуктов распада — пептонов. В двенадцатиперстной кишке происходит более глубокое переваривание белков и пептонов под действием трипсина и пепсинового комплекса ферментов поджелудочного сока. Переваривание до аминокислот и простейших пептидов происходит в тонком кишечнике под влиянием пептидазы кишечного сока (эрепсина).

Продукты распада белка всасываются в виде аминокислот, как показано Е. С. Лондоном, также и в виде простейших пептидов.

Всосавшись из кишечника, аминокислоты и простейшие пептиды частично задерживаются печенью и далее разносятся кровью по всему организму. Когда аминокислоты не поступают из кишечника, печень отдает их в кровь, поддерживая в крови довольно постоянный уровень содержания аминокислот. В крови концентрация аминокислот в эритроцитах всегда выше, чем в окружающей их плазме. Концентрация аминокислот в эритроцитах колеблется, а в плазме поддерживается на довольно постоянном уровне (около 6—8 мг%). Как показано Б. И. Збарским и его сотрудниками, главная масса аминокислот переносится

эритроцитами крови, которые регулируют содержание аминоказота в плазме.

Аминокислоты, доставленные кровью к тканям, идут на построение белков. Аминокислоты, оставшиеся неиспользованными для синтеза белка, а также образовавшиеся в результате протеолиза в тканях, подвергаются ряду превращений. Среди последних важнейшее место занимает открытый А. Е. Браунштейном и М. Г. Крицман процесс переноса аминокруппы — *п е р е а м и н и р о в а н и е*.

При распаде аминокислот в тканях азот аминокислот отщепляется в виде аммиака. Последний, частично соединяясь с кислотами, выделяется с мочой в виде солей аммония. Главная же часть аммиака превращается в мочевины, которая и является главным конечным продуктом белкового обмена у человека¹. Наряду с мочевиной, азот выделяется также в виде креатинина, мочевой кислоты и других веществ.

ПЕРЕВАРИВАНИЕ БЕЛКА ПЕПСИНОМ

Пепсин принадлежит к протеиназам и в кислой среде ($pH=1,5-2$) гидролитически расщепляет белки до пептонов.

Пепсин является главным ферментом желудочного сока.

Переваривание белков пепсином можно хорошо наблюдать на фибрине, который под действием пепсина становится растворимым, переходя в пептон.

П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.

2. Водяная баня.

3. Термометр.

4. Воронка.

5. Фильтровальная бумага.

Р е а к т и в ы. 1. Фибрин.

2. Углекислый натрий, 1% раствор.

3. Соляная кислота, 0,2% раствор.

4. Желудочный сок или 0,1% раствор пепсина в 0,2% соляной кислоте (приготовление см. стр. 327, п. 30).

5. Едкий натр, 10% раствор

6. Сернокислая медь, 1% раствор.

¹ Процесс образования мочевины подробно исследовался И. П. Павловым, М. В. Ненцким, С. С. Салазкиным.

Ход работы

1. В одну пробирку наливают 3—4 мл 0,2% соляной кислоты; во вторую пробирку — 3—4 мл желудочного сока или раствора пепсина в соляной кислоте; в третью пробирку — 3—4 мл желудочного сока или раствора пепсина в соляной кислоте, предварительно нейтрализованного на лакмус содой; в четвертую пробирку — 3—4 мл предварительно прокипяченного и охлажденного желудочного сока или прокипяченного и охлажденного раствора пепсина в соляной кислоте.

2. Помещают в каждую пробирку по небольшому кусочку фибрина примерно равной величины и все пробирки ставят одновременно в водяную баню при 37—40°.

3. Через полчаса или час вынимают пробирки из бани и наблюдают результаты исследования. В первой пробирке должно произойти лишь набухание фибрина под действием кислоты; во второй — переваривание (растворение) фибрина; в третьей — фибрин остается без изменения, так как пепсин в нейтральной среде не активен; в четвертой — происходит набухание фибрина под действием соляной кислоты, но переваривание не имеет места, так как пепсин разрушен кипячением.

4. Отфильтровывают небольшую порцию из каждой пробирки и проделывают с каждым фильтратом биуретовую реакцию. Реакция получается только с фильтратом из второй пробирки, где произошло переваривание фибрина и через фильтр прошли растворимые пептоны.

ПЕРЕВАРИВАНИЕ БЕЛКА ТРИПСИНОМ

Под действием трипсина происходит гидролитическое расщепление пептонов, а также белков. Гидролиз под действием трипсина идет глубоко, вплоть до частичного образования некоторых свободных аминокислот (например, триптофана). Оптимум действия трипсина лежит при слабощелочной реакции ($pH = 8-8,7$).

Обычно белковые вещества расщепляются трипсином скорее, чем пепсином, однако белки кровяной сыворотки и соединительной ткани скорее расщепляются пепсином. Переваривание белков трипсином можно наблюдать на фибрине или казеине, которые под действием трипсина претерпевают глубокое гидролитическое расщепление.

I. Переваривание фибрина

Приборы. 1. Штатив с пробирками.
2. Водяная баня.
3. Термометр.
4. Воронка.
5. Фильтровальная бумага.

Реактивы. 1. Фибрин.
2. Соляная кислота, 1% раствор.
3. Вытяжка трипсина в растворе соды (приготовление см. стр. 322, п. 9) или 2% раствор панкреатина в 0,5% растворе двууглекислого натрия.
4. Едкий натр, 10% раствор.
5. Сернистая медь, 1% раствор.

Ход работы

1. В одну пробирку наливают 3—4 мл раствора трипсина или панкреатина (щелочная среда); во вторую пробирку— 3—4 мл раствора трипсина или панкреатина, предварительно нейтрализованного соляной кислотой на лакмус; в третью пробирку — 3—4 мл подкисленного раствора трипсина или панкреатина.

2. Помещают в каждую пробирку по небольшому кусочку фибрина примерно равной величины и одновременно ставят все пробирки в водяную баню при 37—40°.

3. Через полчаса или час вынимают пробирки из бани и наблюдают результаты исследования. В первой пробирке должно иметь место переваривание (растворение) фибрина; во второй пробирке может быть лишь очень небольшое переваривание, так как в нейтральной среде трипсин слабо активен; в третьей пробирке наблюдается только набухание фибрина.

4. Отфильтровывают часть жидкости из каждой пробирки и проделывают с фильтрами биуретовую реакцию. Положительная реакция указывает на присутствие в фильтрате продуктов переваривания белка.

II. Переваривание казеина

Приборы. 1. Колбочка на 100 мл.
2. Штатив с пробирками.
3. Воронка.

4. Термостат.

5. Термометр.

6. Вата.

- Р е а к т и в ы.
1. Вытяжка трипсина в растворе двууглекислой соды (приготовление см. стр. 322, п. 9) или панкреатин (2% раствор в 0,5% растворе двууглекислого натрия).
 2. Казеин (может быть заменен творогом).
 3. Хлороформ.
 4. Уксусная кислота, концентрированная.
 5. Бромная вода.
 6. Серная кислота, концентрированная.
 7. Сернокислая ртуть, 15% раствор в 6 н. серной кислоте.
 8. Азотная кислота, концентрированная.
 9. Реактив Миллона (приготовление см. стр. 331, п. 46).

Х о д р а б о т ы

1. В колбочку наливают 25—30 мл вытяжки трипсина или раствора панкреатина и помещают туда 3—5 г казеина.

2. Перемешивают содержимое, добавляют около 5 мл хлороформа (для предотвращения гниения), закрывают колбочку ватой и ставят в термостат при 37—40° на 4—5 суток (до следующего занятия).

3. На следующем занятии нагревают колбочку до кипения и добавляют по каплям уксусную кислоту до слабокислой реакции. При этом осаждаются переваренные белки.

4. Охлаждают смесь, погрузив колбочку в холодную воду, и фильтруют для освобождения от белков.

5. Отливают порцию фильтрата (3—4 мл) в пробирку и добавляют по каплям бромную воду.

Появление розово-фиолетового окрашивания, исчезающего от избытка реактива, указывает на присутствие свободного триптофана.

6. К другой порции фильтрата (около 2 мл) добавляют 8—10 капель концентрированной серной кислоты и 5—6 мл раствора сернокислой ртути в серной кислоте, перемешивают содержимое и оставляют стоять на 10—15 минут.

7. Образовавшийся желтый осадок ртутного соединения триптофана отфильтровывают, сохраняя фильтрат, и промывают на фильтре 4—5 маленькими порциями (по 1—2 мл) дистиллированной воды.

8. Небольшим количеством (около 0,5 мл) воды переносят осадок в пробирку. Делят осадок и фильтрат на три части и проделывают как с осадком, так и с фильтратом реакции Адамкевича, Миллона и ксантопротеиновую (см. «Цветные реакции на белки», стр. 8).

Отмечают положительные реакции Адамкевича и ксантопротеиновую и отрицательную реакцию Миллона с осадком, что указывает на присутствие триптофана и отсутствие тирозина.

Положительная ксантопротеиновая и миллонова реакции и отрицательная реакция Адамкевича с фильтратом указывают на наличие в фильтрате тирозина и отсутствие триптофана.

Окрашивание при проведении ксантопротеиновой реакции (в особенности с осадком) появляется медленно (обычно через 15—20 минут).

* ДЕЙСТВИЕ ЭРЕПСИНА НА ПЕПТОН

Под эрепсином понимают комплекс протеолитических ферментов кишечного сока, включающий аминополипептидазу, дипептидазу и некоторые другие ферменты. Эрепсин доводит гидролиз пептонов и полипептидов до свободных аминокислот, которые и всасываются из кишечника в кровь.

П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.

2. Термостат.

3. Термометр.

4. Воронка.

5. Фильтровальная бумага.

Р е а к т и в ы. 1. Вытяжка из тонких кишок (приготовление см. стр. 322, п. 7).

2. Пептон, 1% раствор.

3. Едкий натр, 10% раствор.

4. Сернокислая медь, 1% раствор.

5. Тимол, мелко растертый.

Х о д р а б о т ы

1. В две пробирки помещают приблизительно по 2,5 мл раствора пептона.

2. В одну пробирку добавляют около 5 мл вытяжки из кишок, а в другую — такое же количество прокипяченной вытяжки из кишок.

3. В обе пробирки всыпают по небольшому количеству (около 20 мг) тимола для предохранения от развития микроорганизмов и ставят их в термостат при 37° на 3—4 дня (до следующего занятия).

4. По истечении этого срока нагревают каждую пробирку до кипения и отфильтровывают содержимое.

5. С каждым фильтратом проделывают биуретовую реакцию.

В пробе с прокипяченным экстрактом биуретовая реакция дает фиолетовое окрашивание вследствие присутствия непереваренного пептона. В пробе с непрокипяченным кишечным экстрактом пептон распался и фиолетового окрашивания не наблюдается.

ОСВОБОЖДЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ОТ БЕЛКОВ

При клиническом анализе и в научно-исследовательской работе постоянно приходится определять в крови и других биологических жидкостях ряд различных низкомолекулярных веществ. Присутствие белков вследствие способности их реагировать с самыми разнообразными реактивами препятствует такого рода определениям; поэтому для определения различных продуктов обмена веществ, как, например, сахара (см. стр. 138), кальция (см. стр. 243), а также лекарственных препаратов и токсических веществ необходимо предварительно освободить жидкость от белков.

Для удаления белков пользуются рядом способов, основанных на реакциях осаждения белков (см. стр. 19).

Наиболее употребительным способом является осаждение белков трихлоруксусной, вольфрамовой или метафосфорной кислотами. Применяется также осаждение кипячением с уксусной кислотой (в присутствии солей) и гидратами окисей тяжелых металлов.

В качестве примера приведем удаление белков из сыворотки крови.

П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.

2. Воронка.

Р е а к т и в ы. 1. Сыворотка крови, разведенная в 5—6 раз водой.

2. Трихлоруксусная кислота, 8% раствор.
3. Метафосфорная кислота, 10% раствор.
4. Вольфрамовокислый натрий, 5% раствор.
5. Серная кислота, $\frac{1}{3}$ н. раствор.
6. Уксусная кислота, 1% раствор.
7. Сернокислый цинк, 4,5% раствор.
8. Едкий натр, 4% раствор.
9. Азотная кислота, концентрированная.
10. Сульфосалициловая кислота, 20% раствор.

Ход работы

1. В 5 пробирок наливают приблизительно по 5 мл разведенной сыворотки.

2. В первую пробирку добавляют около 5 мл раствора трихлоруксусной кислоты и взбалтывают.

3. Во вторую пробирку добавляют около 1 мл раствора метафосфорной кислоты и взбалтывают.

4. В третью пробирку добавляют около 1 мл вольфрамовокислого натрия и около 1 мл серной кислоты и взбалтывают.

5. В четвертую пробирку добавляют 10—15 капель раствора уксусной кислоты и тщательно кипятят.

6. В пятую пробирку приливают около 5 мл раствора сернокислого цинка и около 1 мл раствора едкого натра и кипятят. Во всех пробирках выпадают в осадок белки.

7. Отфильтровывают содержимое каждой пробирки от осадка белка.

8. С каждым фильтратом проделывают затем реакции на белок с сульфосалициловой кислотой и с концентрированной азотной кислотой (см. стр. 26 и 27).

Отрицательные реакции на белок в фильтрате указывают на полноту освобождения жидкости от белка.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО И ОСТАТОЧНОГО АЗОТА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Всосавшиеся аминокислоты претерпевают в органах и тканях различные изменения. Часть аминокислот идет на образование белковых веществ органов и тканей, часть

превращается в другие биологически важные азотистые вещества (ферменты, гормоны и т. п.), часть подвергается распаду. В связи с этими процессами синтеза и распада разнообразные азотистые вещества постоянно находятся в тканях и биологических жидкостях. В частности, в крови к азотистым веществам принадлежат собственно белки, полипептиды, аминокислоты, мочевины, креатинин, мочевая кислота, соли аммония и др.

Определение количества каждого из этих азотистых веществ в отдельности весьма важно при изучении обмена белков. Однако ввиду сложности подобного анализа в клинике ограничиваются обычно определением общего и остаточного азота в сыворотке крови.

Обычно начинают с определения общего азота, т. е. всей суммы азота, содержащегося во всех азотистых веществах. Затем в другой порции сыворотки тем или иным способом осаждают белки. В безбелковом фильтрате вновь определяют азот, содержащийся в небелковых азотистых веществах. В отличие от «общего азота» этот азот называют «остаточным азотом», т. е. азотом веществ, оставшихся в растворе после осаждения белков.

В норме в сыворотке человека содержится 1060—1300 мг% общего азота и 20—30 мг% остаточного азота. Так как цифра общего азота представляет собой сумму белкового и остаточного азота, то белковый азот вычисляют по разности общего и остаточного азота. Белкового азота в норме в сыворотке содержится около 1150 мг%.

Цифру белкового азота выражают в количестве белка в сыворотке. Так как содержание азота в белках в среднем равно 16%, то, чтобы получить количество белка, умножают цифру белкового азота на 6,25 ($100 : 16 = 6,25$).

В норме сыворотка содержит 6,5—8,5% белка. Повышенное содержание белка в сыворотке крови (гиперпротеинемия) наблюдается при ревматизме, пониженное (гипопротеинемия) — при нефрозах, истощении, белковом голодании и при раке.

Количество остаточного азота (включающего главным образом азот аминокислот, пептидов, мочевины и солей аммония) увеличивается при ряде заболеваний, связанных с повышенным распадом белков, при лихорадочных состояниях, нефрозе, желтой атрофии и других заболеваниях печени, при заболеваниях почек, нарушении минерального обмена и др.

I. Определение общего и остаточного азота сыворотки крови по Кьельдалю

Определение общего и остаточного азота обычно производится по методу Кьельдаля.

Исследуемое вещество помещают в особую колбу — колбу Кьельдаля, куда прибавляют концентрированной серной кислоты, и нагревают в присутствии катализатора (сернокислой меди или ртути). При этом вещество разрушается. Продукты распада частично улетучиваются, а весь азот, выделяющийся в форме аммиака, связывается серной кислотой, образуя нелетучую соль — сернокислый аммоний. На полученный таким образом сернокислый аммоний действуют затем щелочью, чтобы вновь выделить из сернокислого аммония весь азот в форме аммиака. Последний отгоняется и улавливается определенным количеством титрованной серной кислоты. Узнав титрованием, сколько миллилитров 0,05 н. кислоты связалось с аммиаком, определяют, сколько в исследуемом веществе имеется азота, исходя из того, что каждому миллилитру связанной 0,05 н. серной кислоты соответствует 0,0007 г азота.

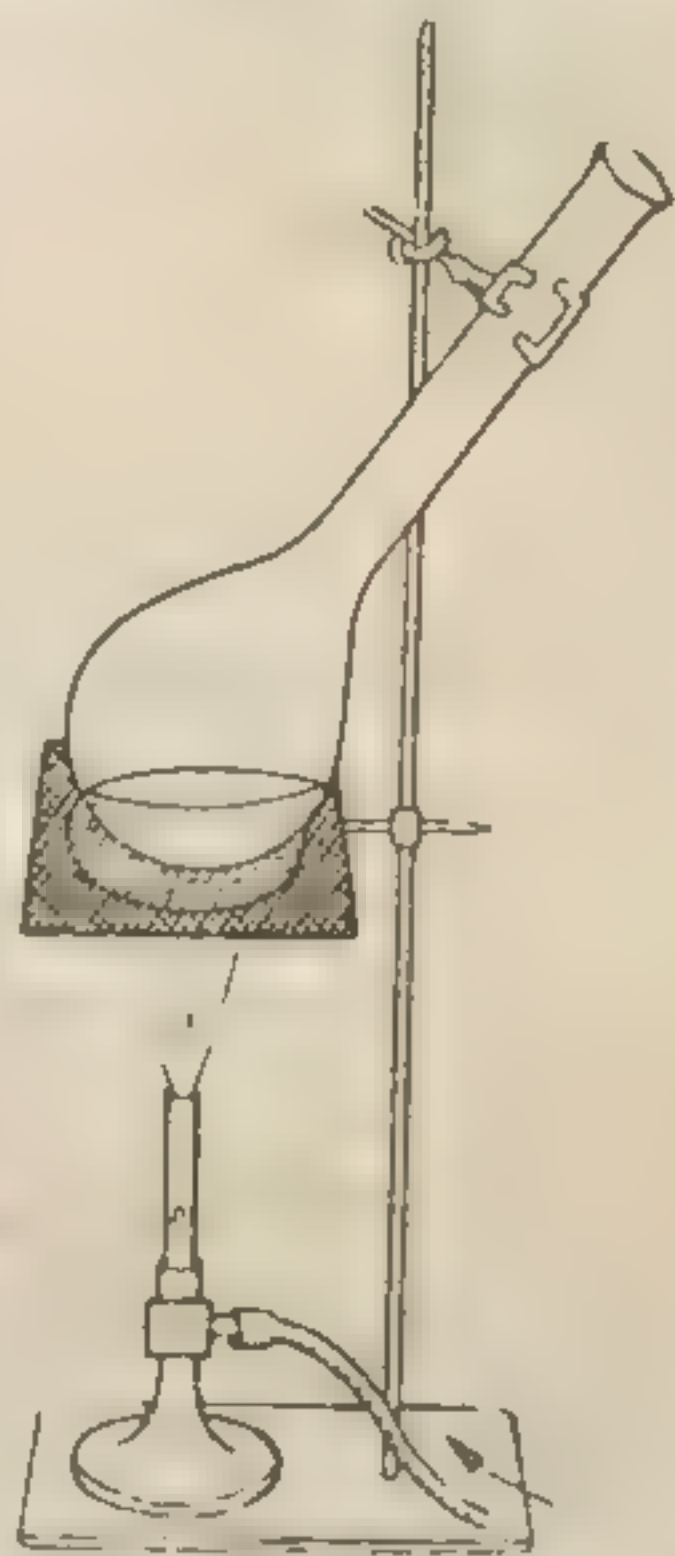


Рис. 13. Сжигание по Кьельдалю.

- П р и б о р ы.
1. Колбочки на 25—30 мл, 3 шт.
 2. Колбы Кьельдаля для сжигания (рис. 13).
 3. Прибор для отгонки аммиака (рис. 14).
 4. Пипетка на 10 мл с делениями.
 5. Бюретка с дистиллированной водой.
 6. Пипетка на 3 мл.
 7. Пипетка на 1 мл.
 8. Мерный цилиндр на 10—15 мл.
 9. Мерный цилиндр на 25—50 мл.

- Р е а к т и в ы.
1. Серная кислота, концентрированная.
 2. Медный купорос, кристаллический.
 3. Едкий натр, 33% раствор.

4. Серная кислота, титрованный 0,05 н. раствор.
5. Едкий натр, титрованный 0,05 н. раствор.
6. Метилловый оранжевый или метиловый красный, 0,2% раствор в спирте.
7. Сернокислый калий в порошке.
8. Свежепрокаленные кусочки фарфора или стеклянные капилляры.
9. Трихлоруксусная кислота, 8% раствор.

Ход работы

1. Отмеривают в колбочку 10 мл сыворотки и осаждают в ней белки 10 мл раствора трихлоруксусной кислоты.

2. Отфильтровывают содержимое от осадка белка в сухую колбочку.

3. В другую колбочку отмеривают 1 мл сыворотки и 9 мл воды и перемешивают.

4. В одну колбу для сжигания отмеривают 10 мл безбелкового фильтрата сыворотки — для определения остаточного азота, в другую колбу для сжигания вносят пипеткой 3 мл разведенной в 10 раз сыворотки — для определения общего азота и в третью колбу — 10 мл дистиллированной воды для проведения «слепого» опыта (контроль на содержание аммиака в реактивах).

5. Отмеривают цилиндром в каждую колбу для сжигания по 3 мл концентрированной серной кислоты.

6. Добавляют в каждую колбу по 0,2 г медного купороса (в качестве катализатора) и около 1 г сернокислого калия (для повышения температуры кипения смеси).

7. Нагревают все три колбы в вытяжном шкафу сначала осторожно, а затем сильнее до полного осветления жидкости (отсутствия частиц угля). При этом органические вещества сначала обугливаются, а затем сгорают. После осветления колбы кипятят еще 15 минут.

8. Дают колбам остыть и осторожно вливают в них по стенкам при помешивании около 50 мл дистиллированной воды. Далее приступают к отгонке, пользуясь прибором, изображенным на рис. 14.

Если для сжигания были взяты кьельдалевские колбы маленького размера, то отгонку необходимо производить в других колбах. Для этого содержимое колбы количе-

ственно переносят в колбу для отгонки *a*. Колбу Кьельдаля (для сжигания) несколько раз тщательно промывают небольшими порциями дистиллированной воды, сливая ее в колбу для отгонки.

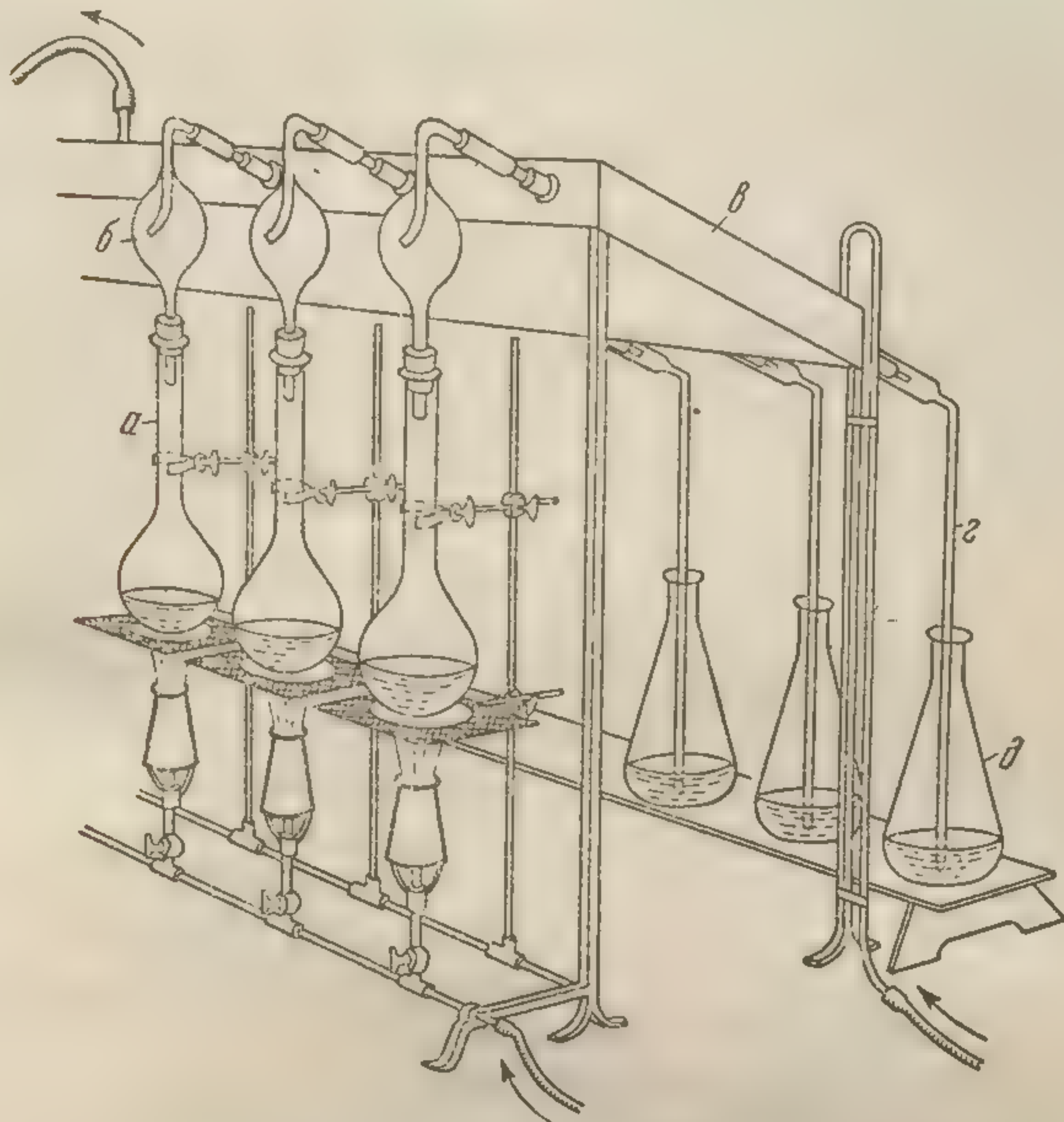


Рис. 14. Прибор для отгонки аммиака.

9. Подготавливают приемную колбу *d*, наливая в нее из бюретки точно отмеренное количество (10—15 мл) 0,05 н. раствора серной кислоты. Объем титрованной кислоты должен несколько превышать количество, необходимое для связывания всего отгоняемого аммиака.

10. Добавляют в приемную колбу 2—3 капли раствора индикатора метилового красного или метилового оранжевого.

11. Пускают воду в холодильник *в* отгонного аппарата и погружают в серную кислоту приемной колбы конец перегонной трубки *г* таким образом, чтобы он был

на несколько миллиметров ниже поверхности титрованного раствора кислоты¹.

12. Помещают в перегонную колбу кусочки фарфора или стеклянные капилляры для равномерного кипения.

13. Вливают очень осторожно, по стенке, в отгоночную колбу 15—18 мл 33% раствора едкого натра. Приливание надо производить аккуратно и быстро, во избежание потерь аммиака.

При приливании щелочи следует избегать смачивания верхней внутренней части горлышка отгоночной колбы, где в дальнейшем будет пробка. Отсутствие в этом месте щелочи обеспечит необходимое замыкание, и пробка не выскочит во время работы.

14. Быстро и в то же время осторожно соединяют отгоночную колбу с перегонным аппаратом и затем слегка перемешивают содержимое колбы.

15. Зажигают горелку и отгоняют аммиак в приемную колбу в течение 12—15 минут. Началом отгонки считают тот момент, когда насадка б станет горячей. Затем вынимают конец перегонной трубки г из кислоты и обмывают его из промывалки или пипетки над приемной колбой несколькими миллилитрами дистиллированной воды. Убеждаются в том, что аммиак отогнан полностью с помощью красной лакмусовой бумажки (от капли отгона она не должна синеть), и продолжают отгонку еще 10—15 минут. Тушат горелку и выключают холодильник.

16. Оттитровывают содержимое приемной колбы 0,05 н. раствором щелочи до появления желтой (метилоранжевый) или оранжевой (метилоранжевый) окраски.

17. Параллельно с вышеописанным проделывают те же операции, начиная с п. 8, с остальными двумя колбами (для определения общего азота и проведения слепого опыта)².

18. Производят расчеты, которые будут ясны из следующего примера.

Взято в приемную колбу 15 мл 0,05 н. серной кислоты. На титрование в слепом опыте пошло 14,93 мл 0,05 н. едкого натра.

¹ Во избежание засасывания титрованной кислоты в перегонную колбу, нужно следить за тем, чтобы конец перегонной трубки в течение перегонки не погружался слишком глубоко (не глубже 2—3 мм) в титрованную кислоту.

² Так как на определение всех проб требуется много времени, то определение остаточного азота, общего азота и слепого опыта могут выполнять разные студенты.

На т
ло 12,98
мняком
Так

азота (в
в два ра
0,7·1,95

На т
10,18 мл
Следо

0,05 н.

Отсю

0,7·4,75

3,325·10

3

общего

Проц

ности об

Отсю
ка, или,

II. С

Опис
(см. стр.
териала
ской ра
зуются
кол и ч

Изме
аммиа
в спел
вания б
микр
кельдал
ние оста
сыворотк

На титрование при определении остаточного азота пошло 12,98 мл 0,05 н. NaOH. Следовательно, связано аммиаком $14,93 - 12,98 = 1,95$ мл 0,05 н. H_2SO_4 .

Так как 1 мл 0,05 н. серной кислоты связывает 0,7 мг азота (в виде аммиака), то в 10 мл фильтрата разведенной в два раза (при осаждении белков) сыворотки содержится $0,7 \cdot 1,95 = 1,36$ мг азота. Отсюда сыворотка содержит:

$$\frac{1,36 \cdot 2 \cdot 100}{10} = 27,2 \text{ мг\% остаточного азота.}$$

На титрование при определении общего азота пошло 10,18 мл 0,05 н. едкого натра.

Следовательно, связано аммиаком: $14,93 - 10,18 = 4,75$ мл 0,05 н. серной кислоты.

Отсюда 3 мл разведенной в 10 раз сыворотки содержат $0,7 \cdot 4,75 = 3,325$ мг азота; или сыворотка содержит:

$$\frac{3,325 \cdot 10 \cdot 100}{3} = 1108,3 \text{ мг\% азота, или, округляя, } 1,11\%$$

общего азота.

Процент азота белка в сыворотке вычисляется по разности общего и остаточного азота, т. е. составляет:

$$1,1083 - 0,0272 = 1,0811\%.$$

Отсюда сыворотка содержит: $1,0811 \cdot 6,25 = 6,7569\%$ белка, или, округляя, 6,76% белка.

II. Определение остаточного азота сыворотки крови микрометодом Кьельдаля

Описанное выше определение азота по Кьельдалю (см. стр. 167) требует сравнительно большого количества материала и реактивов. Поэтому как в научно-исследовательской работе, так и для клинических анализов чаще пользуются тем же методом, приспособленным для малых количеств (микрокьельдаль).

Изменения метода заключаются в том, что отгонку аммиака производят с водяным паром в специальном приборе (рис. 15), а для титрования берут более разведенные растворы и пользуются микробюреткой. При аккуратной работе микрокьельдаль не уступает в точности макрометоду. Определение остаточного азота можно произвести в 1 мл крови (или сыворотки крови).

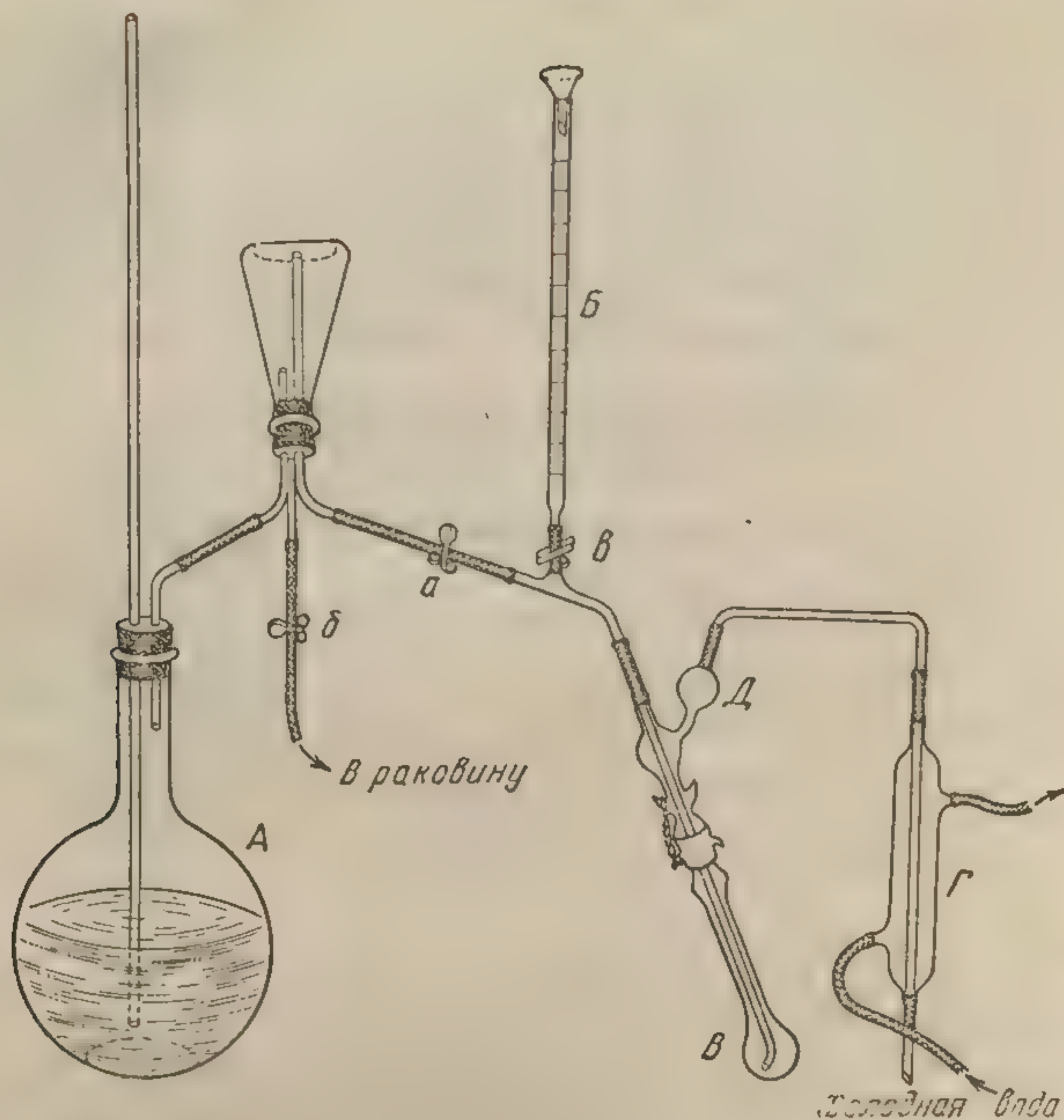


Рис. 15. Аппарат для определения азота микрометодом Кьельдаля.

- П р и б о р ы.
1. Штатив с сухими пробирками.
 2. Воронки с фильтрами, 2 шт.
 3. Пипетка на 1 мл.
 4. Пипетка на 2 мл.
 5. Колбочки Кьельдаля для сжигания на 15—25 мл, 2 шт.
 6. Аппарат для отгонки аммиака (рис. 15).
 7. Прокаленный фарфор, кусочками.
 8. Цилиндр на 10—15 мл с делениями.
 9. Конические колбочки для титрования на 25—50 мл, 2 шт.
 10. Микробюретка.

- Р е а к т и в ы.
1. Сыворотка крови.
 2. Трихлоруксусная кислота, 8% раствор.
 3. Серная кислота, концентрированная.

4. Смесь 1 части медного купороса с 3 частями сернокислого калия.
5. Едкий натр, 33% раствор.
6. Серная кислота, 0,01 н. раствор.
7. Едкий натр, 0,01 н. раствор.
8. Метиловый красный, 0,2% раствор в спирте.

Ход работы

1. Пропаривают аппарат для отгонки. Для этого в колбу А наливают водопроводную воду и помещают туда несколько кусочков прокаленного фарфора. Открывают зажим а, закрывают зажим б и кипятят воду в парообразователе А, не пуская тока воды в холодильник.

2. Отмеривают в сухую пробирку 1 мл сыворотки крови. В другую (контрольную) пробирку отмеривают 1 мл дистиллированной воды.

3. В обе пробирки прибавляют по 1 мл раствора трихлоруксусной кислоты и встряхивают содержимое пробирок.

4. Отфильтровывают в сухие пробирки безбелковый фильтрат от осадка белка в опытной пробе и жидкость в контрольной пробе¹.

5. Отмеривают в колбочку для сжигания 1 мл безбелкового фильтрата сыворотки. В другую колбочку для сжигания отмеривают 1 мл фильтрата контрольной пробы.

6. Всыпают в каждую колбочку для сжигания по 0,5 г смеси медного купороса и сернокислого калия и добавляют по 1 мл концентрированной серной кислоты.

7. Сжигают обе пробы до полного осветления жидкости на горелке (рис. 13) или на песчаной бане. После осветления жидкости колбочки для сжигания продолжают кипятить еще около 15 минут.

8. Подготавливают аппарат для отгонки. Для этого пускают воду в холодильник Г, открывают зажим б, снимают колбу В и закрывают зажим а, продолжая кипятить воду в парообразователе.

9. Отмеривают в две конические колбочки точно по 2 мл 0,01 н. серной кислоты, добавляют по капле индикатора и подставляют одну из приемных колбочек под холодильник Г, погрузив конец холодильника на 2—3 мм в титрованный раствор кислоты.

¹ Вместо фильтрования можно центрифугировать.

10. Дают колбочкам для сжигания остыть, смывают содержимое контрольной колбочки 8—10 мл воды в отгонную колбу *В* аппарата для отгонки аммиака и подсоединяют колбочку *В* к прибору.

11. В бюретку *Б* наливают 33% раствор щелочи и осторожно при помощи зажима *в* впускают в отгонную колбу 5 мл раствора щелочи.

12. Открывают зажим *а*, закрывают зажим *б* и отгоняют аммиак в приемник в течение 5 минут, считая с момента, когда каплеуловитель *Д* станет горячим.

13. Опускают приемную колбу так, чтобы конец холодильника был над поверхностью жидкости; обмывают конец холодильника 2—3 мл дистиллированной воды в приемную колбочку и продолжают отгонку с непогруженным холодильником еще 2 минуты.

14. Отставляют приемную колбочку от холодильника и открывают зажим *б*. Отгонную колбу *В* отнимают от прибора, выливают из нее жидкость и споласкивают ее водой. Закрывают зажим *а*.

15. Смывают в отгонную колбу *В* содержимое опытной колбочки для сжигания и отгоняют из нее аммиак в другую приемную колбу, как описано выше.

16. По окончании отгонки второй пробы отставляют приемную колбочку, открывают зажим *б*, снимают отгонную колбу *В* и ополаскивают ее водой. Выключают газ и холодильник.

Оттитровывают содержимое каждой отгонной колбочки и рассчитывают содержание остаточного азота в сыворотке в мг%. Принцип расчета такой же, как и для макрокельдаля (см. стр. 171).

Допустим, что на титрование контрольной пробы пошло 1,97 мл 0,01 н. раствора NaOH, на титрование опытной пробы—0,86 мл титрованной щелочи.

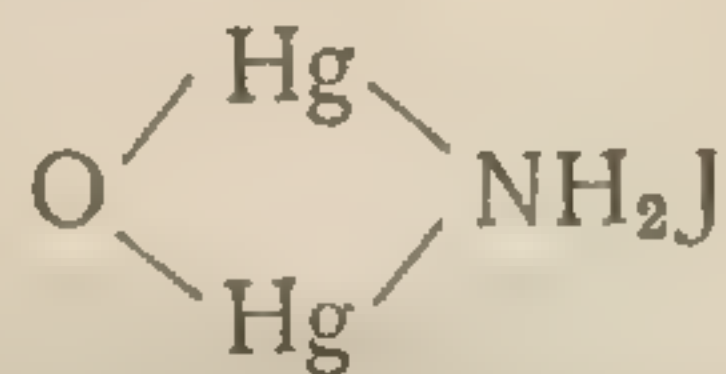
Таким образом, связалось $1,97 - 0,86 = 1,11$ мл 0,01 н. H_2SO_4 . Каждый миллилитр 0,01 н. кислоты соответствует 0,14 мг азота. Всего в пробе $1,11 \times 0,14 = 0,1554$ мг азота. Так как взят 1 мл безбелкового фильтрата после разведения сыворотки вдвое, то в 1 мл сыворотки содержится вдвое больше остаточного азота, а в 100 мл — еще в 100 раз больше. Таким образом, содержание остаточного азота в сыворотке в данном примере:

$$(1,97 - 0,86) \cdot 0,14 \cdot 2 \cdot 100 = 0,1554 + 200 = 31,08 \text{ мг\%}.$$

III. Колориметрическое определение остаточного азота крови

После сжигания по Кьельдалю (см. стр. 167) азот в виде аммонийных солей может быть определен колориметрическим способом (см. стр. 118). Колориметрическое определение еще более чувствительно, чем микрокьельдаль (см. стр. 171), и при массовых определениях сокращает время работы, так как не связано с процедурой отгонки и титрования. Благодаря этим преимуществам колориметрическое определение остаточного азота крови часто применяется при клиническом анализе.

Принцип определения заключается в том, что после сжигания количество азота определяется по интенсивности окраски со специальным реактивом на аммиак (реактив Несслера). Интенсивность окраски сравнивается в колориметре с окраской стандартного раствора аммонийной соли. Действующим началом реактива Несслера является иодная ртуть в щелочном растворе, которая образует с аммиаком окрашенное в желтый цвет соединение (иодистый меркураммоний).



- П р и б о р ы.
1. Штатив с сухими пробирками.
 2. Воронка с фильтром.
 3. Пипетка на 10 мл с делениями.
 4. Микропипетка на 0,2 мл.
 5. Пипетка на 1 мл с делениями.
 6. Пипетка на 1 мл.
 7. Колбочка для сжигания по Кьельдалю.
 8. Пипетка на 3 мл.
 9. Мерные колбочки или пробирки с меткой на 10 мл, 2 шт.
 10. Игла для взятия крови.
 11. Вата.

- Р е а к т и в ы.
1. Этиловый спирт.
 2. Диэтиловый эфир.
 3. Вольфрамовокислый натрий, 10% раствор.
 4. Серная кислота, $\frac{2}{3}$ н. раствор.
 5. Серная кислота, 10% раствор.

6. Перекись водорода, 30% раствор.
7. Сернокислый аммоний, стандартный раствор, содержащий 0,05 мг азота в 1 мл (приготовление см. стр. 332, п. 55).
8. Реактив Несслера (приготовление см. стр. 331, п. 48).

Ход работы

1. В сухую пробирку отмеривают 5,4 мл дистиллированной воды.
2. Берут из пальца микропипеткой (см. стр. 78) точно 0,2 мл крови, обтирают кончик микропипетки ватой от приставшей снаружи крови и выдувают кровь в пробирку с водой. Микропипетку трижды промывают, осторожно набирая и выпуская обратно содержимое пробирки, для того чтобы всю отмеренную кровь полностью перевести в пробирку.
3. В пробирку приливают при помешивании 0,2 мл раствора вольфрамОВОкислого натрия и 0,2 мл $\frac{2}{3}$ н. раствора серной кислоты и тщательно перемешивают.
4. Содержимое пробирки отфильтровывают от выпавшего осадка белков крови в другую сухую пробирку.
5. Отмеривают 3 мл фильтрата (что соответствует 0,1 мл крови) в колбочку для сжигания, добавляют 1 мл 10% серной кислоты и осторожно упаривают на горелке (см. рис. 13) или песчаной бане и нагревают до появления белых густых паров.
6. Дают колбочке охладиться, добавляют 1—2 капли перекиси водорода и вновь нагревают и кипятят до обесцвечивания и просветления жидкости.
7. По охлаждении колбочки разбавляют содержимое 1—2 мл дистиллированной воды и количественно переводят его в мерную колбочку (или пробирку), смывая остаток небольшими порциями воды.
8. В другую мерную колбочку отмеривают 1 мл стандартного раствора сернокислого аммония и добавляют 1 мл 10% раствора серной кислоты и 3—4 мл воды.
9. В обе мерные колбочки добавляют по 3 мл реактива Несслера, доводят в них объем водой до метки и перемешивают содержимое каждой колбочки.
10. Колориметрируют опытный раствор по стандарту

(см. стр. 11)
в крови в
Допустим
дартного ра
для высоты
Так как
азота и опре
ви содержа
30
 $0,05 \cdot \frac{30}{44,8}$

ОПРЕДЕЛ
РАСПРЕД

Определе
изучения о
н о к и с л о
Х р о м а
(см. стр. 93)
нокислот, но
какие и
н о к и с л о
ствуют в ис
териале.

Для опре
нокислот на
метод ра
тельной
графи
ро в а л ь н
Метод закл
что подвиж
тель (обыкно
насыщенный
сывается по
ровальной б
кает за соб
лоты. Отдель
слоты в ра
стают от «ф
бумаги выс
(см. стр. 12),
является в ви
ков) (рис. 16)
12 Практикум по

(см. стр. 118) и вычисляют содержание остаточного азота в крови в мг%.

Допустим, что в нашем случае при высоте столба стандартного раствора 30 мм среднее из нескольких отсчетов для высоты столба опытного раствора составляет 44,8.

Так как 1 мл стандартного раствора содержит 0,05 мг азота и определение велось в 0,1 мл крови, а в 100 мл крови содержание азота в 1 000 раз больше, то кровь содержит $0,05 \cdot \frac{30}{44,8} \cdot 1\,000 = 33,6$ мг% остаточного азота.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

Определение свободных аминокислот весьма важно для изучения обмена белков и отдельных аминокислот в организме.

Хроматографический метод М. С. Цвета (см. стр. 93) позволяет не только установить наличие аминокислот, но и определить, какие именно аминокислоты присутствуют в исследуемом материале.

Для определения аминокислот наиболее удобен метод распределительной хроматографии на фильтровальной бумаге. Метод заключается в том, что подвижной растворитель (обыкновенно фенол, насыщенный водой) насыщается полосой фильтровальной бумаги и увлекает за собой аминокислоты. Отдельные аминокислоты в разной степени удерживаются бумагой и отстают от «фронта» растворителя. Если потом полоску бумаги высушить и опрыснуть раствором нингидрина (см. стр. 12), то местоположение отдельных аминокислот выявляется в виде синих и фиолетовых пятен (разных оттенков) (рис. 16). Положение пятна, т. е. отношение расстоя-

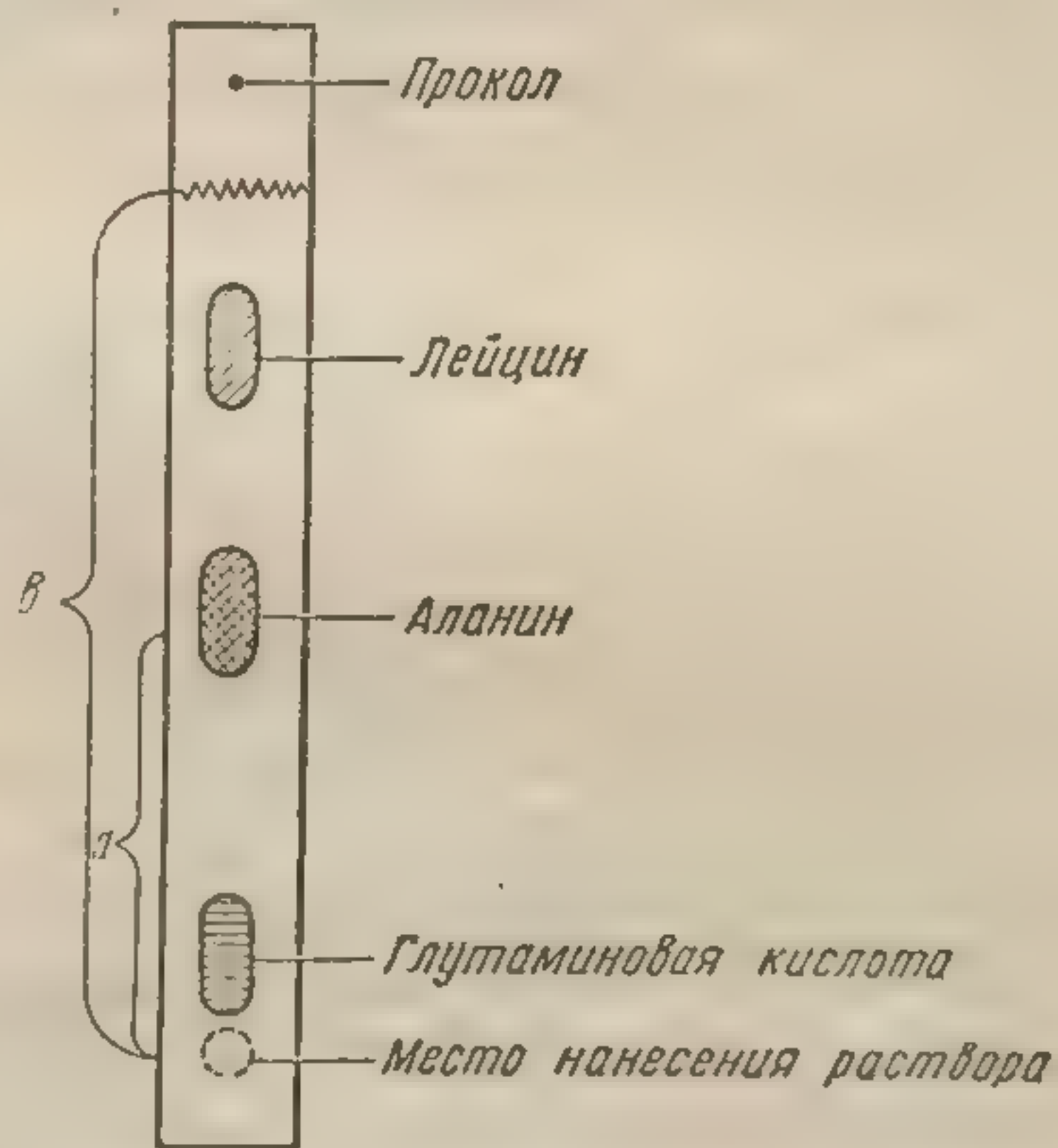


Рис. 16. Хроматограмма аминокислот.

12 Практикум по биологической химии

ния его середины от места нанесения испытуемой смеси к расстоянию «фронта» растворителя от места нанесения смеси (коэффициент), характерно для данной аминокислоты в данных условиях (растворителя, температуры, сорта бумаги и т. п.). Например, на рис. 16 для аланина коэффициент равен $\alpha : \beta$. Как показали исследования, разделение веществ при распределительной хроматографии зависит не от адсорбции (так как чистая бумага — клетчатка практически не адсорбирует аминокислот), а от распределения аминокислоты между фенолом и водой. Дело в том, что воздушносухая фильтровальная бумага всегда удерживает некоторое количество влаги и, таким образом, играет роль водной колонки. Коэффициент данной аминокислоты (положение пятна) зависит поэтому от соотношения ее растворимости в феноле к растворимости в воде. Чем больше растворимость в феноле, тем дальше (ближе к фронту растворителя) отойдет пятно; чем больше растворимость в воде, тем больше аминокислота будет удерживаться влагой, содержащейся в бумаге, и тем меньше будет соответствующий коэффициент.

Метод распределительной хроматографии на бумаге применяется для анализа не только аминокислот, но и ряда других веществ. Большим преимуществом этого метода является то, что он позволяет исследовать ничтожные (порядка микрограммов — миллионных грамма) количества аминокислот или других веществ. Мы описываем упрощенный метод хроматографического разделения аминокислот в пробирке.

Для этого метода удобно применять раствор, содержащий глутаминовую кислоту, аланин и лейцин. При отсутствии этих аминокислот их можно заменить другими комбинациями с достаточно отличающимися коэффициентами (см. стр. 330, п. 45).

П р и б о р ы. 1. Сухая пробирка (желательно широкая) с пробкой.

2. Полоска фильтровальной бумаги (10—15 мм на 120—130 мм).

3. Нитки и игла.

4. Сушильный шкаф, нагретый до 100° , снабженный перекладиной с крючками для подвешивания полосок бумаги.

5. Термостат, нагретый до $35-40^{\circ}$.

ре а

1. Бер
ности не
делают п
вают ее

2. В
насыщен
на стенк

(Осторо
ожогой!)

3. На
колу, об
кружок д
бумаги.

4. В п
ленькую
сушивают

5. Бер
кают ее
бумаги с
пробирку
образом,
пробкой,

6. Ста
при $35-40^{\circ}$

1. Хром
но в этом
растворител
туры, врем
бумага.

6. Пульверизатор.
7. Капилляр.
8. Кусок чистого и сухого стекла.
9. Линейка с делениями.
10. Деревянный зажим.
11. Пипетка.

Р е а к т и в ы. 1. Фенол, насыщенный водой (приготовление см. стр. 333, п. 60).
 2. Нингидрин, 0,1% раствор в спирте.
 3. Раствор аминокислот (приготовление см. стр. 330, п. 45).

Х о д р а б о т ы

1. Берут полоску фильтровальной бумаги, по возможности не загрязняя ее пальцами. На одном конце полоски делают прокол иглой, продевают в прокол нитку и завязывают ее петлей.

2. В пробирку наливают пипеткой 0,5—1 мл фенола, насыщенного водой, следя за тем, чтобы фенол не попал на стенки пробирки.

(Осторожно! При попадании на кожу фенол вызывает ожоги!)

3. На конце бумажной полоски, противоположном проколу, обводят карандашом (не чернильным и не цветным) кружок диаметром в 2—4 мм, отступя на 5—7 мм от края бумаги.

4. В центр кружка наносят при помощи капилляра маленькую каплю раствора аминокислот (рис. 17) и подсушивают ее на воздухе.

5. Берут полоску бумаги левой рукой за нитку и опускают ее в пробирку до соприкосновения нижнего края бумаги с фенолом. Придерживая нитку, плотно закрывают пробирку пробкой, регулируя положение бумажки таким образом, чтобы она висела вертикально на нитке, зажатой пробкой, и погружалась в фенол на 1—2 мм (рис. 18).

6. Ставят пробирку в штатив и помещают ее в термостат при 35—40° на 1¹/₂—2 часа¹.

¹ Хроматограмму можно вести и при комнатной температуре, но в этом случае время, необходимое для продвижения фронта растворителя, вдвое больше, чем в термостате. Помимо температуры, время получения хроматограммы тем больше, чем плотнее бумага.

7. Через $1\frac{1}{2}$ –2 часа, когда бумага насосет фенол на 8–10 см, полоску бумаги вынимают и подвешивают за нитку в сушильный шкаф при 100° (в вытяжном шкафу) на 10–15 минут для испарения фенола.

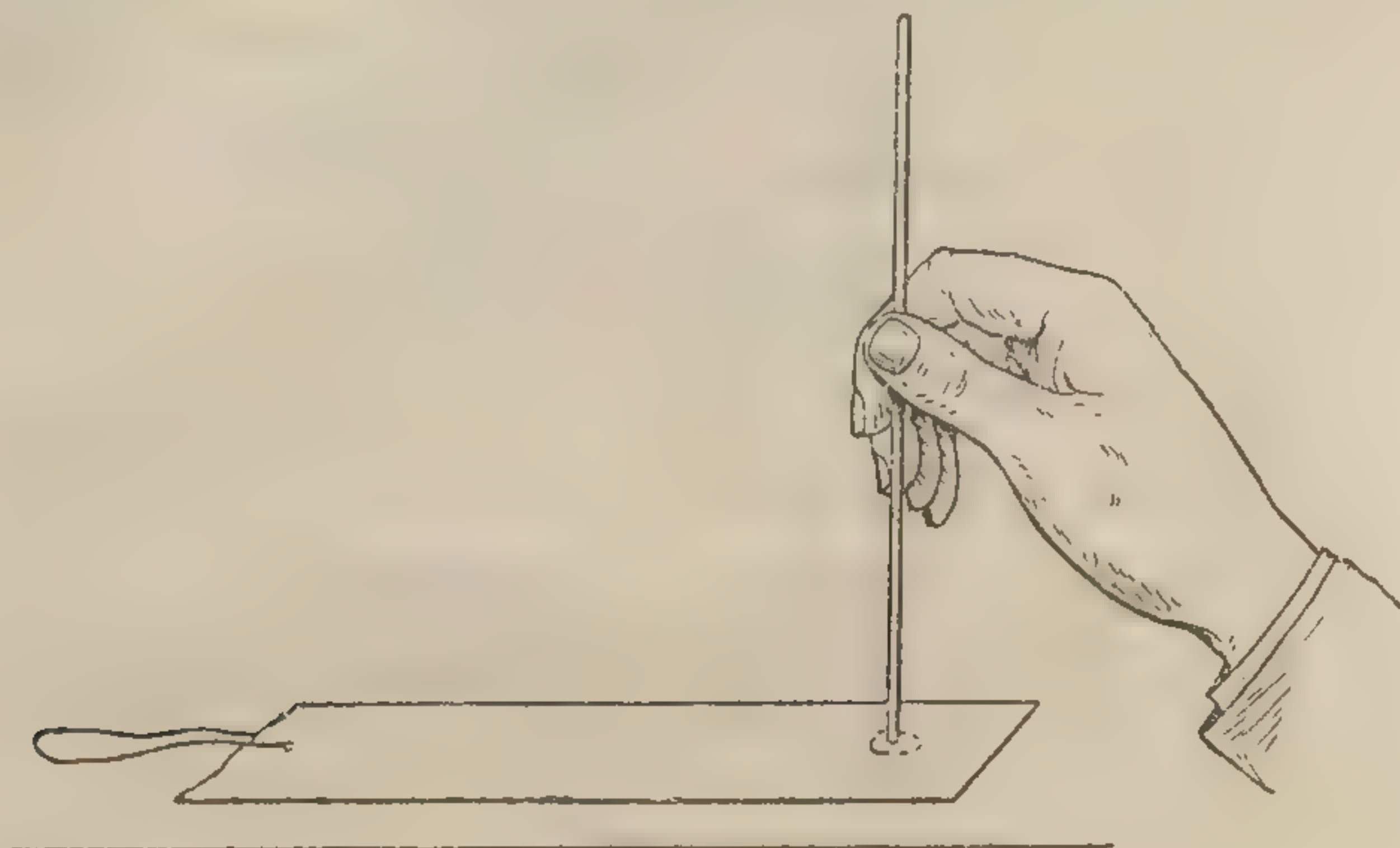


Рис. 17. Нанесение раствора аминокислот.

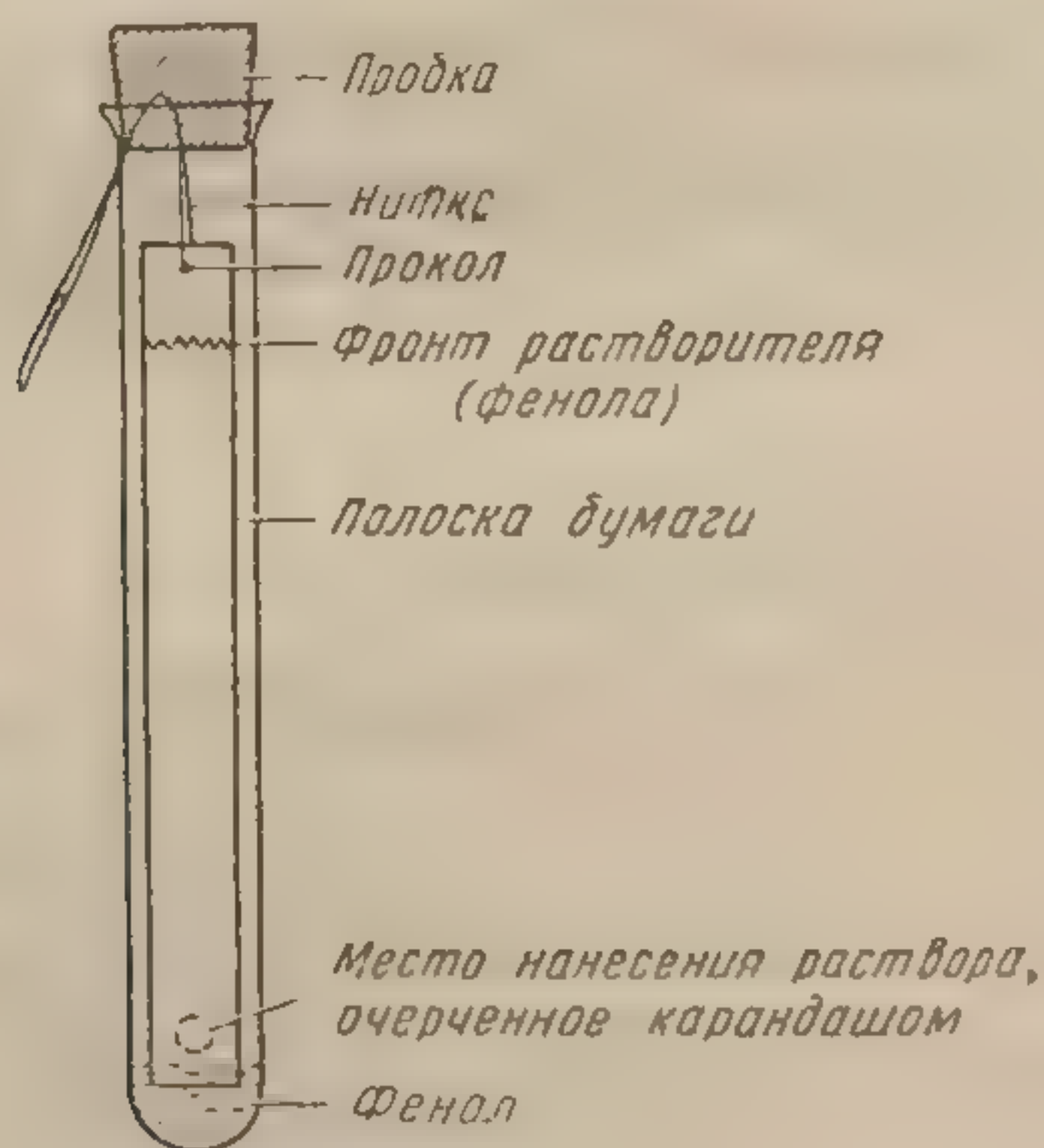


Рис. 18. Упрощенный прибор для распределительной хроматографии.

8. Сухую полоску бумаги прикрепляют зажимом к стеклу или подвешивают за нитку и опрыскивают из пульверизатора раствором нингидрина. Затем бумажку снова подвешивают в сушильный шкаф на 5–6 минут.

9. Вынимают полоску бумаги из сушильного шкафа, кладут ее на стекло или лист бумаги и линейкой измеряют расстояние середины пятен и фронта растворителя от исходной точки нанесения раствора.

10. Вычисляют коэффициенты для глутаминовой кислоты (первое пятно), аланина (второе пятно) и лейцина (третье пятно) (или других аминокислот) и записывают результаты, сохраняя хроматограмму в дневнике.

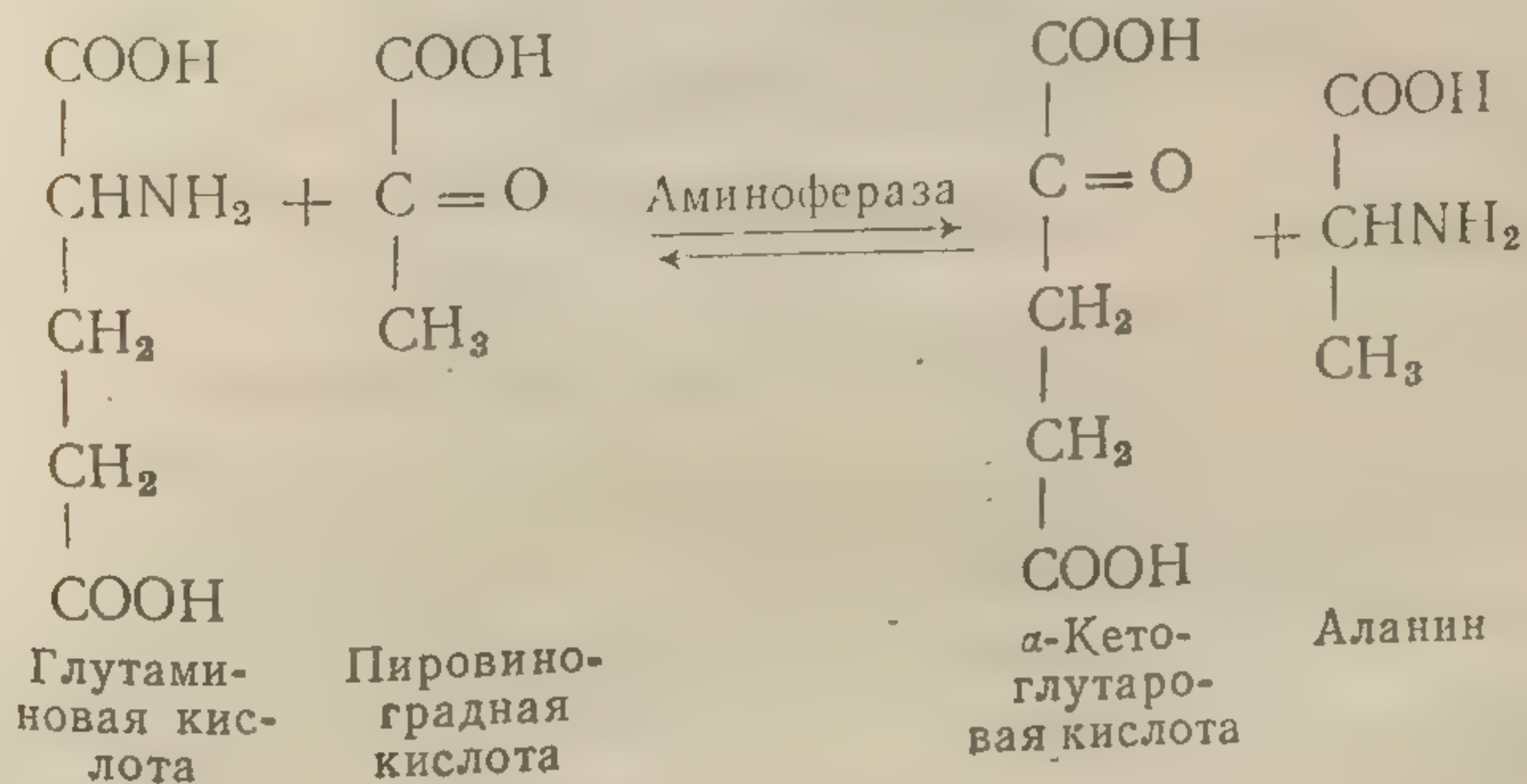
* ПЕРЕАМИНИРОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТ

Переаминированием называется процесс ферментативного переноса аминогрупп аминокислот на кетокислоты, открытый и подробно исследованный А. Е. Браунштейном и М. Г. Крицман. Обязательным компонентом системы переаминирования является д и к а р б о н о в а я а м и н о- или к е т о к и с л о т а.

Переаминирование широко распространено в различных тканях животных и растений.

Благодаря этому процессу в организме может осуществляться синтез ряда аминокислот и некоторых других соединений из их углеродного скелета. Переаминирование происходит под действием ферментов а м и н о ф е р а з, оптимум действия которых лежит в слабо щелочной среде (pH=7,4).

Процесс переаминирования удобно наблюдать на мышечной каше, используя в качестве аминокислоты глутаминовую, а в качестве кетокислоты — пировиноградную кислоту. В этом случае реакция идет по схеме:



Для того чтобы наблюдать переаминирование, предотвращают процесс гликолиза, при котором пировиноградная кислота превращается в молочную. Гликолиз обычно отравляют монобромуксусной кислотой.

Процесс переаминирования обратим и для его исследования обычно количественно определяют прирост или уменьшение концентрации участвующих в реакции кето- и аминокислот. О происходящем переаминировании можно судить также по появлению аланина на хроматограмме.

Приборы. 1. Штатив с пробирками.
2. Пробки к пробиркам.
3. Пипетка на 1 мл с делениями.
4. Водяная баня.
5. Воронки с фильтрами, 2 шт.
6. Приборы, необходимые для распределительной хроматографии на бумаге (стр. 178).

Реактивы. 1. Глутаминовая кислота, 1% раствор, нейтрализованный едким кали.
2. Пировиноградная кислота, 1% раствор, нейтрализованный едким кали (получение см. стр. 327, п. 32).
3. Кислый углекислый калий, 0,1% раствор.
4. Монобромуксусная кислота, 0,025% раствор, нейтрализованный едким кали (синтез см. стр. 326, п. 22).
5. Мышечная кашица (приготовление см. стр. 326, п. 24).
6. Реактивы, необходимые для распределительной хроматографии на бумаге (стр. 179), кроме раствора аминокислот.
7. Уксусная кислота, 2% раствор.

Ход работы

1. В две пробирки отмеривают по 0,5 мл раствора глутаминовой кислоты, 0,5 мл раствора пировиноградной кислоты, 1 мл раствора двууглекислого калия и 0,25 мл раствора монобромуксусной кислоты.

2. Д
кашиц
нагрев
1—2 м

Рис.
Ослабле
алан

3. С
баню
содерж
4.
бавля
и кип

2. Добавляют в обе пробирки по 0,5 г свежей мышечной кашицы. Вторую (контрольную) пробирку сейчас же нагревают до кипения и осторожно кипятят в течение 1—2 минут.

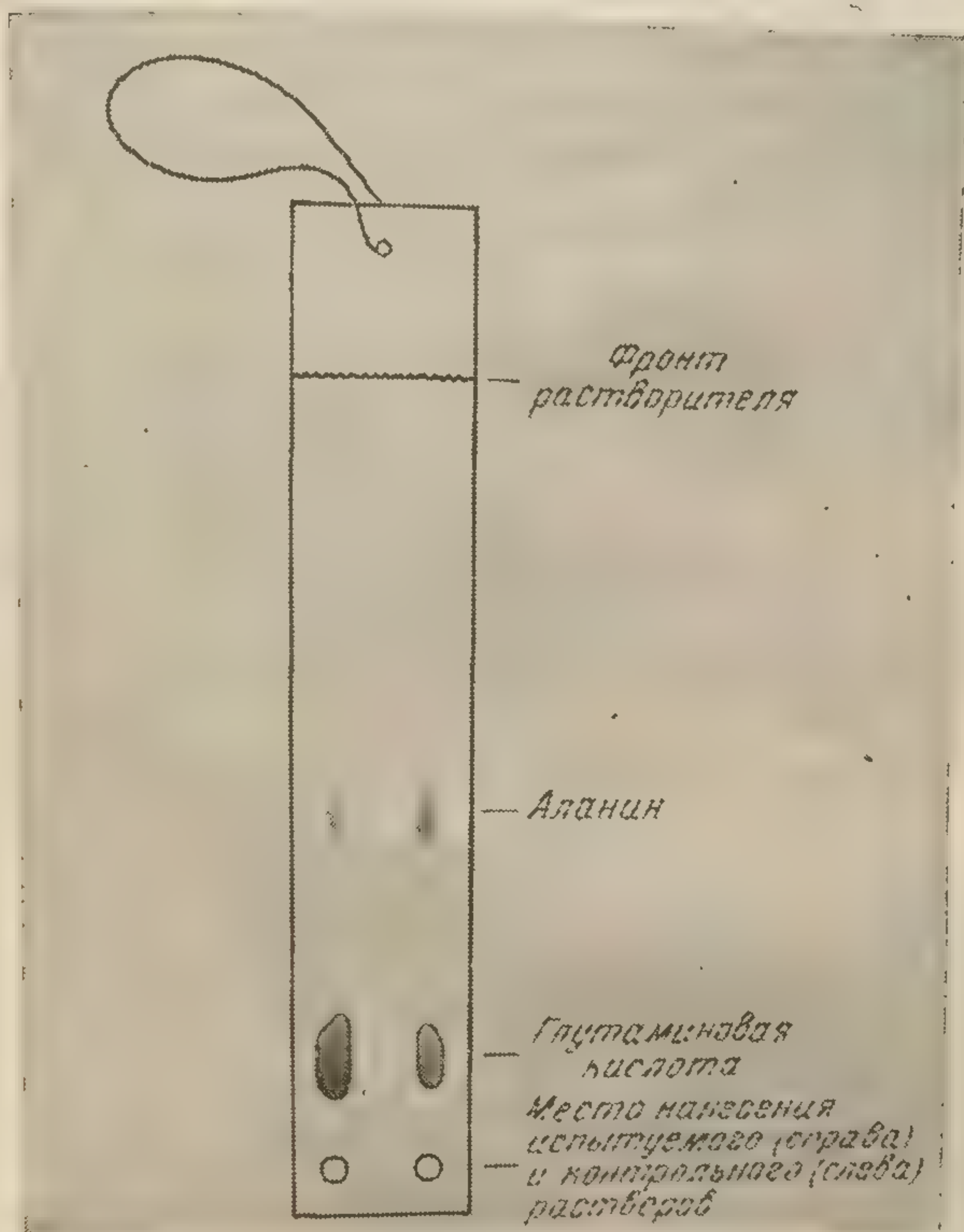


Рис. 19. Хроматограмма мышечной кашицы после осаждения белков.

Ослабление пятна глутаминовой кислоты и появление (или усиление) пятна аланина в опытном растворе указывает на процесс персаминирования.

3. Обе пробирки закрывают пробками и ставят в водяную баню при 38° на $1\frac{1}{2}$ —2 часа, многократно перемешивая содержимое.

4. Через $1\frac{1}{2}$ —2 часа вынимают пробирки из бани, добавляют в каждую пробирку по 0,25 мл уксусной кислоты и кипятят до полного свертывания белков.

5. Отфильтровывают содержимое каждой пробирки в чистые пробирки, отмечая их теми же номерами. Закрывают пробирки пробками и оставляют их до следующего занятия (желательно в холодном месте).

6. На следующем занятии хроматографируют оба раствора (см. стр. 177) на одной полоске бумаги шириной в 2,5 см, используя для этого достаточно широкую пробирку и стараясь наносить одинаковые количества каждого раствора¹. Ввиду малой концентрации глутаминовой кислоты и образующегося аланина наносят растворы по 2 раза на то же место, предварительно подсушив на воздухе каплю, нанесенную первый раз.

7. Хроматограмму рассматривают на листе белой бумаги или в проходящем свете. Так как мышечная кашица содержит небольшие количества свободных аминокислот, в частности, аланина, на хроматограмме контрольного раствора, наряду с ярким пятном глутаминовой кислоты, может проявиться очень слабое пятно аланина. Опытная проба дает явное пятно аланина и ослабленное пятно глутаминовой кислоты (рис. 19).

* ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОАЗОТА ГАЗОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ ПО ЦУВЕРКАЛОВУ

Количественное определение свободных аминных групп аминокислот, полипептидов и белков широко применяется для исследования ферментативного распада белковых веществ и их гидролиза другими способами (см. стр. 34). Помимо ценных сведений о строении белковой молекулы и переваривания белков, определение аминокислот дает возможность судить о содержании свободных аминокислот и пептидов в крови, моче и других жидкостях и тканях организма.

Для определения аминокислот применяется ряд методов. Газометрическое определение по выделению свободного азота является одним из наиболее точных способов и имеет ряд преимуществ перед методом формольного титрования (см. стр. 37), в особенности для исследования белкового обмена.

¹ Если не удастся подобрать достаточно широкую пробирку, можно хроматографировать каждый раствор отдельно в обычных пробирках.

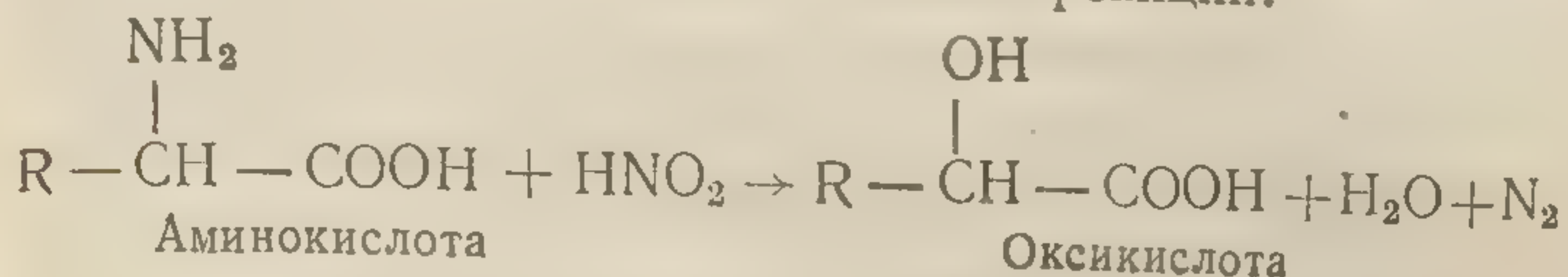
Газометрический
первый
с азотом
свободный
 NH_2
|
 $\text{R}-\text{CH}-$
Амин

Амин
этом
и переход
а выделя
полов
нокис
ну и 3
кислот
реакция
то одно
ложение
деление

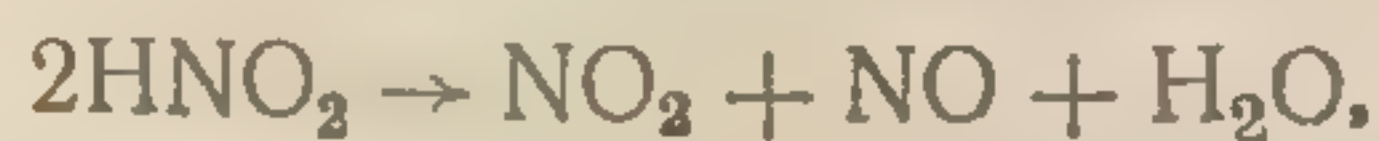
2HNO_3

которые
бодного
измерить
азота, ок
но по
ным р
цов ок
Аппар
(рис. 20)
ской мик
двухходов
ной к кра
Газометр
нена кау
телем 2,
сообщает
Прибо
сасывают
натрия и

Газометрическое определение основано на реакции первичной аминогруппы аминокислот с азотистой кислотой и выделении при этом свободного азота согласно реакции:



Аминокислота при этом дезаминируется и переходит в оксикислоту, а выделяющийся азот состоит наполовину из азота аминокислоты и наполовину из азота азотистой кислоты. Так как указанная реакция протекает в кислой среде, то одновременно происходит разложение азотистой кислоты и выделение окислов азота:



которые мешают определению свободного азота. Чтобы можно было измерить объем выделившегося азота, окислы азота предварительно поглощают щелочным раствором марганцовокислого калия.

Аппарат Д. А. Цуверкалова (рис. 20) состоит из газометрической микробюретки *в*, снабженной двухходовым краном *б* с припаянной к крану небольшой бюреткой *а*. Газометрическая бюретка *в* соединена каучуковой трубкой со смесителем *г*, который в свою очередь сообщается с грушей *д*.

Прибор заполняют ртутью. Через бюретку *а* в него засасывают испытуемый раствор, раствор азотистокислого натрия и уксусную кислоту, следя за тем, чтобы в микро-

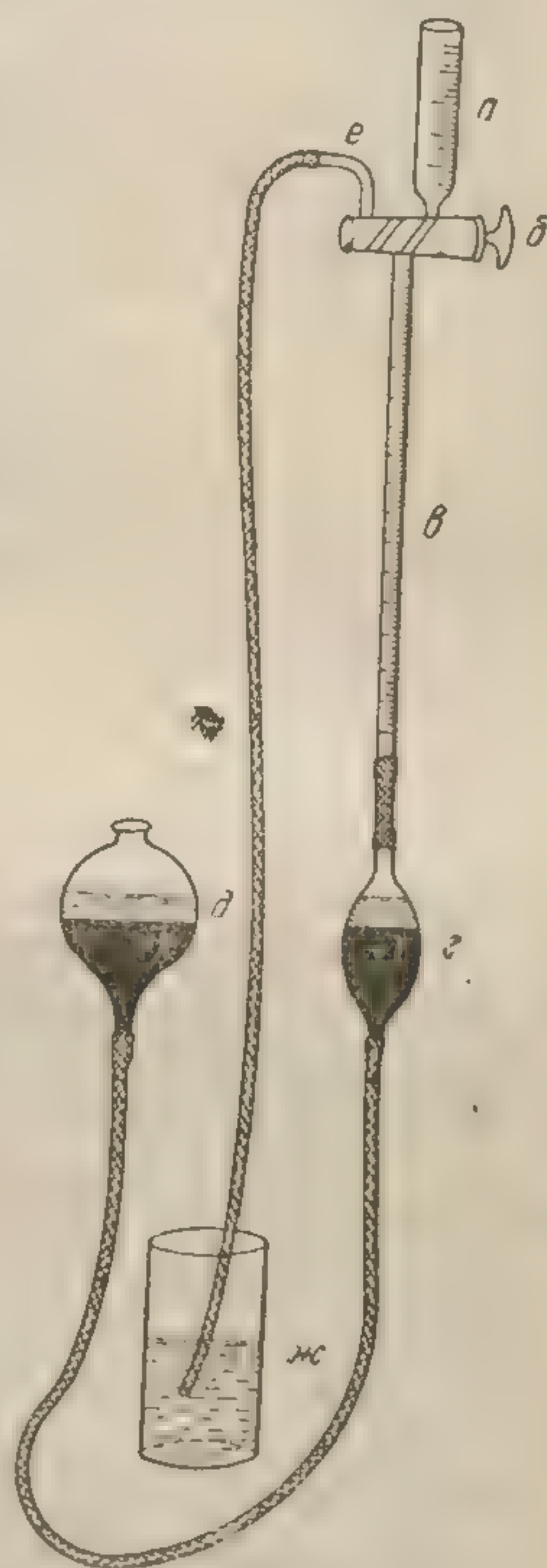


Рис. 20. Аппарат Цуверкалова.

бюретку *в* не попадал воздух. После того как реакция закончится, впускают щелочной раствор перманганата для поглощения окислов азота. Затем измеряют объем выделившегося свободного азота. Учитывая температуру и давление, рассчитывают количество аминокислоты, памятуя, что он составляет половину всего выделившегося азота.

П р и б о р ы. 1. Аппарат Цуверкалова (рис. 20)
2. Пипетка на 1 мл.
3. Пипетка на 5 мл с делениями.
4. Барометр.
5. Термометр.

Р е а к т и в ы. 1. Глицин, 0,02 м. раствор или разведенный гидролизат белка.
2. Уксусная кислота, 50% раствор.
3. Азотистокислый натрий, 30% раствор, свежеприготовленный.
4. Щелочной раствор перманганата (приготовление см. стр. 334, п. 68).

Х о д р а б о т ы

1. Открывают двухходовой кран *б* на соединение с отростком *е*. Поднятием груши со ртутью *д* вытесняют из микробюретки *в* воду, которой заполнен аппарат, в сосуд для слива *ж* и доводят уровень ртути до крана.

2. Поворачивают кран на соединение с бюреткой *а* и, поднимая грушу, заполняют ртутью каналец крана и дно бюретки *а*, после чего кран закрывают.

3. Опускают грушу и закрепляют ее в кольце штатива, создавая таким образом отрицательное давление в приборе.

4. В бюретку *а* отмеряют точно 1 мл испытуемого раствора (глицина или гидролизата белка).

5. Осторожно поворачивая кран *б* на соединение с бюреткой *а*, впускают испытуемый раствор в микробюретку *в*, избегая попадания в бюретку *в* воздуха, т. е. оставляя очень немного раствора в бюретке *а* над краном.

Если при этой операции воздух все же попал в микробюретку *в*, его удаляют поднятием груши.

6. Наливают в бюретку *а* 1—1,5 мл раствора уксусной кислоты и переводят ее описанным выше способом в микробюретку *в*. Затем таким же образом вводят в бюретку *в*

1—1,5 мл
чаях, во
личество р
7. Встр
который
наполовину
нирования
лагается с
8. Ввод
выше спос
ната, не да
9. Снов
нут для п
10. Под
на соедине
зырьком га
(нулевой
11. Уста
смесителе
выделивше
12. Нал
твора пер
в пп. 9—1
Если пр
поглощение
объема газа
ние законч
13. Откр
нятием гру
слива *ж*.
14. Про
затем уксус
боре) и еще
этой цели к
микробюрет
воротом кра
на соединен
поверхность
ретку *в* де
ретку *а*.
15. Повт
раствора дес
контролем

1—1,5 мл раствора азотистокислого натрия. В обоих случаях, во избежание засасывания воздуха, небольшое количество раствора оставляют в бюретке *a*.

7. Встряхивают в течение $1\frac{1}{2}$ —2 минут смеситель *г*, который должен быть заполнен ртутью приблизительно наполовину. За это время заканчивается процесс дезаминирования аминокислот, а избыток азотистой кислоты разлагается с выделением окислов азота.

8. Вводят через бюретку *a* в микробюретку *в* описанным выше способом 8—10 мл щелочного раствора перманганата, не давая воздуху попасть в бюретку *в*.

9. Снова встряхивают смеситель *г* в течение $1\frac{1}{2}$ —2 минут для поглощения окислов азота.

10. Поднимают грушу *и*, осторожно поворачивая кран на соединение с отростком *е*, выпускают жидкость над пузырьком газа и доводят пузырек газа точно до края крана (нулевой отсчет микробюретки).

11. Устанавливают грушу так, чтобы ртуть в груше *д* и в смесителе *г* была на одном уровне, и точно измеряют объем выделившегося газа.

12. Наливают в бюретку *a* еще около 5 мл щелочного раствора перманганата и повторяют операции, описанные в пп. 9—11.

Если при отсчете объем газа уменьшается, то повторяют поглощение окислов азота перманганатом до постоянного объема газа. По достижении постоянного объема определение закончено.

13. Открывают кран на соединение с отростком *е* и поднятием груши *и* выводят отреагировавшую смесь в сосуд для слива *ж*.

14. Промывают прибор сначала 2—3 порциями воды, затем уксусной кислотой и нитритом (смешивая их в приборе) и еще 5—6 порциями дистиллированной воды. Для этой цели каждую порцию наливают в бюретку *a*, вводят в микробюретку *в* опусканием груши *и* соответствующим поворотом крана, затем выводят в сосуд *ж* поворотом крана на соединение с отростком *е* и поднятием груши *д*. Когда поверхность ртути станет чистой, заполняют микробюретку *в* дистиллированной водой, вводя ее через бюретку *a*.

15. Повторяют определение, беря вместо испытуемого раствора дистиллированную воду. Это определение служит контролем на реактивы и необходимо для получения точ-

ных результатов. Количество выделившегося азота в таком «слепом» опыте не должно превышать 0,05 мл¹.

16. Вычисляют количество азота аминокислот во взятой пробе и в миллиграмм-процентах в испытуемом растворе.

Для этого из объема газа в опытной пробе вычитают объем газа в контрольной пробе. Полученный объем выделившегося азота приводят к нормальным условиям (0° и 760 мм), пересчитывают на вес в миллиграммах и делят пополам (так как только половина азота происходит от аминокислот).

Для приведения к нормальным условиям пользуются формулой:

$$v_0 = \frac{v(p - b) \cdot 273}{760(273 + t)},$$

где v_0 — объем газа при нормальных условиях; v — объем выделившегося азота в условиях опыта; p — давление, при котором производилось определение, в миллиметрах ртутного столба; t — температура, при которой производилось определение; b — давление насыщенного водяного пара при температуре t (находят по таблице X в приложении, стр. 342).

Найдя объем выделившегося азота при нормальных условиях, вычисляют его вес. Исходя из того, что одна грамм-молекула газа (т. е. 28 г азота) занимает объем в 22,4 л,

определяют, что 1 мл азота должен весить $\frac{28}{22,4} = 1,2508$ мг.

Отсюда объем выделившегося азота нужно помножить на 1,2508. Разделив полученное количество азота на 2, получают количество мг азота аминокислот во взятой пробе.

Приведенный сложный расчет показывает общие принципы вычислений в газовом анализе.

На практике для определения азота аминокислот пользуются табл. 4, приведенной на стр. 189. В верхней строке таблицы находят барометрическое давление P , а в первом столбце — температуру t° , при которых производился опыт. На месте пересечения находят непосредственно вес 1 мл аминного азота при данных температуре и давлении. Вес дается уже с учетом того, что при реакции с азотистой кислотой лишь половина азота происходит от аминокислот. Пользование этой таблицей значительно упрощает расчеты.

¹ Если один студент не успевает проделать в течение занятия оба определения, то контрольный опыт следует провести в лаборантской, а результаты его дать студентам для производства расчетов.

Таблица 4

Аминный азот в миллиграммах, соответствующий 1 мл газообразного азота в аппарате
Цуверкалова при различной температуре и давлении

t° \ P	728	730	732	734	736	738	740	742	744	746	748	750	t°
11	0,5680	0,5695	0,5710	0,5725	0,5745	0,5760	0,5775	0,5790	0,5805	0,5820	0,5840	0,5855	11
12	0,5655	0,5670	0,5685	0,5700	0,5720	0,5735	0,5750	0,5765	0,5780	0,5795	0,5815	0,5830	12
13	0,5630	0,5645	0,5660	0,5675	0,5695	0,5710	0,5725	0,5740	0,5755	0,5770	0,5785	0,5805	13
14	0,5605	0,5620	0,5635	0,5650	0,5665	0,5680	0,5700	0,5715	0,5730	0,5745	0,5760	0,5775	14
15	0,5580	0,5595	0,5610	0,5625	0,5640	0,5655	0,5670	0,5685	0,5705	0,5720	0,5735	0,5750	15
16	0,5555	0,5570	0,5585	0,5600	0,5615	0,5630	0,5645	0,5660	0,5675	0,5690	0,5710	0,5725	16
17	0,5525	0,5540	0,5555	0,5575	0,5590	0,5605	0,5620	0,5635	0,5650	0,5665	0,5680	0,5695	17
18	0,5500	0,5515	0,5530	0,5545	0,5560	0,5580	0,5595	0,5610	0,5625	0,5640	0,5655	0,5670	18
19	0,5475	0,5490	0,5505	0,5520	0,5535	0,5550	0,5565	0,5580	0,5595	0,5610	0,5630	0,5645	19
20	0,5445	0,5460	0,5475	0,5495	0,5510	0,5525	0,5540	0,5555	0,5570	0,5585	0,5600	0,5615	20
21	0,5420	0,5435	0,5450	0,5465	0,5480	0,5495	0,5510	0,5525	0,5540	0,5555	0,5575	0,5590	21
22	0,5395	0,5410	0,5425	0,5440	0,5455	0,5470	0,5485	0,5500	0,5515	0,5530	0,5545	0,5560	22
23	0,5365	0,5380	0,5395	0,5410	0,5425	0,5440	0,5455	0,5470	0,5485	0,5500	0,5515	0,5530	23
24	0,5335	0,5350	0,5365	0,5380	0,5400	0,5415	0,5430	0,5445	0,5460	0,5475	0,5490	0,5505	24
25	0,5310	0,5325	0,5340	0,5355	0,5370	0,5385	0,5400	0,5415	0,5430	0,5445	0,5460	0,5475	25
26	0,5280	0,5295	0,5310	0,5325	0,5340	0,5355	0,5370	0,5385	0,5400	0,5415	0,5430	0,5445	26
27	0,5250	0,5255	0,5280	0,5295	0,5310	0,5325	0,5340	0,5355	0,5370	0,5385	0,5400	0,5415	27
28	0,5220	0,5235	0,5250	0,5265	0,5280	0,5295	0,5310	0,5325	0,5340	0,5355	0,5370	0,5385	28
29	0,5195	0,5210	0,5220	0,5235	0,5250	0,5265	0,5280	0,5295	0,5310	0,5325	0,5340	0,5355	29
30	0,5160	0,5175	0,5190	0,5205	0,5220	0,5235	0,5250	0,5265	0,5280	0,5295	0,5310	0,5325	30

Таблица 4 (продолжение)

P t°	752	754	756	758	760	762	764	766	768	770	772	t°
11	0,5870	0,5885	0,5900	0,5915	0,5935	0,5950	0,5965	0,5980	0,5995	0,6010	0,6030	11
12	0,5845	0,5860	0,5875	0,5890	0,5905	0,5925	0,5940	0,5955	0,5970	0,5985	0,6000	12
13	0,5820	0,5835	0,5850	0,5865	0,5880	0,5895	0,5910	0,5930	0,5945	0,5960	0,5975	13
14	0,5790	0,5805	0,5825	0,5840	0,5855	0,5870	0,5885	0,5900	0,5915	0,5935	0,5950	14
15	0,5765	0,5780	0,5795	0,5810	0,5830	0,5845	0,5860	0,5875	0,5890	0,5905	0,5920	15
16	0,5740	0,5755	0,5770	0,5785	0,5800	0,5815	0,5830	0,5850	0,5865	0,5880	0,5895	16
17	0,5710	0,5730	0,5745	0,5760	0,5775	0,5790	0,5805	0,5820	0,5835	0,5850	0,5865	17
18	0,5685	0,5700	0,5715	0,5730	0,5745	0,5765	0,5780	0,5795	0,5810	0,5825	0,5840	18
19	0,5660	0,5675	0,5690	0,5705	0,5720	0,5735	0,5750	0,5765	0,5780	0,5795	0,5810	19
20	0,5630	0,5645	0,5660	0,5675	0,5690	0,5705	0,5725	0,5740	0,5755	0,5770	0,5785	20
21	0,5605	0,5620	0,5635	0,5650	0,5665	0,5680	0,5695	0,5710	0,5725	0,5740	0,5755	21
22	0,5575	0,5590	0,5605	0,5620	0,5635	0,5650	0,5665	0,5680	0,5695	0,5715	0,5730	22
23	0,5545	0,5560	0,5575	0,5595	0,5610	0,5625	0,5640	0,5655	0,5670	0,5685	0,5700	23
24	0,5520	0,5535	0,5550	0,5565	0,5580	0,5595	0,5610	0,5625	0,5640	0,5655	0,5670	24
25	0,5490	0,5505	0,5520	0,5535	0,5550	0,5565	0,5580	0,5595	0,5610	0,5625	0,5640	25
26	0,5460	0,5475	0,5490	0,5505	0,5520	0,5535	0,5550	0,5565	0,5580	0,5595	0,5610	26
27	0,5430	0,5445	0,5460	0,5475	0,5490	0,5505	0,5520	0,5535	0,5550	0,5565	0,5580	27
28	0,5400	0,5415	0,5430	0,5445	0,5460	0,5475	0,5490	0,5505	0,5520	0,5535	0,5550	28
29	0,5370	0,5385	0,5400	0,5415	0,5430	0,5445	0,5460	0,5475	0,5490	0,5505	0,5520	29
30	0,5340	0,5355	0,5370	0,5385	0,5400	0,5415	0,5430	0,5445	0,5460	0,5475	0,5490	30

Привед
0,62 мл аз
тура опыта
что в этих
Осюда во
(0,62 —
Так как
держат сос
творе соде

Мочеви
ным пр
и многих
подробно
И. А. Зал
чевины в
чевина вы
Мочеви
ной ки
мус, но с
азотокис
ны своей
При г
газ и амн

Гидрол
уреазы,
стениях.
Действ
запах пос
мочевинны
При н
и образую
твой реа
Окисл
с выде

Приведем пример. В опытной пробе (1 мл) выделилось 0,62 мл азота, в контрольной пробе — 0,03 мл. Температура опыта 21°. Давление — 750 мм. По таблице находим, что в этих условиях 1 мл соответствует 0,559 мг сухого азота. Отсюда во взятой пробе содержится:

$$(0,62 - 0,03) \cdot 0,559 = 0,59 \cdot 0,559 = 0,33 \text{ мг азота.}$$

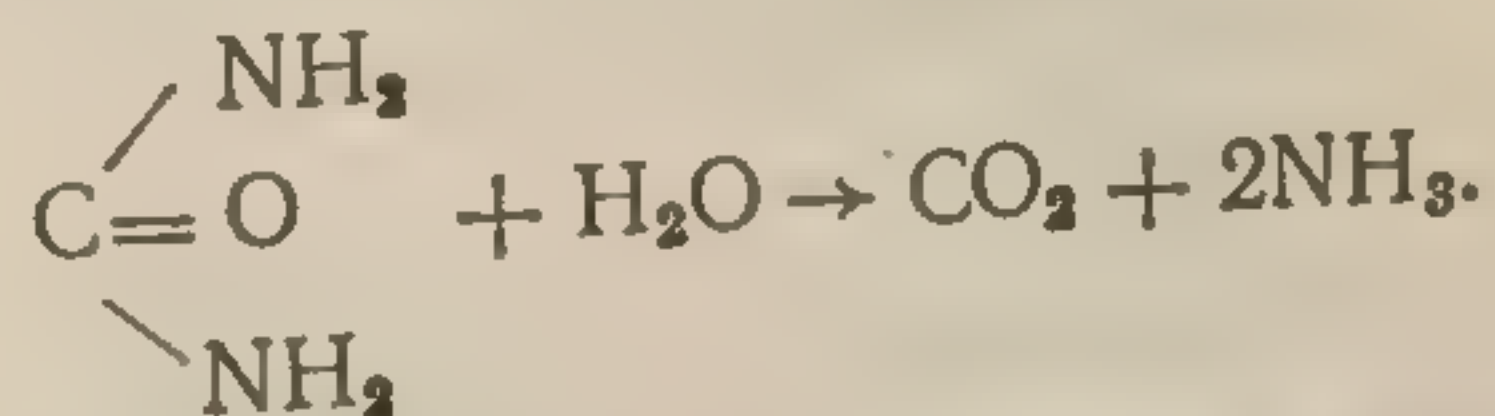
Так как взят 1 мл испытуемого раствора, то 100 мл содержат соответственно 33 мг азота, т. е. в испытуемом растворе содержится 33 мг% азота аминокислот.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА МОЧЕВИНУ

Мочевина $\text{H}_2\text{N} - \text{CO} - \text{NH}_2$ является главным конечным продуктом обмена белков у человека и многих животных. Образование мочевины в организме подробно изучалось И. П. Павловым, М. В. Ненцким, И. А. Залесским и С. С. Салазкиным. Местом синтеза мочевины в организме является главным образом печень. Мочевина выводится преимущественно с мочой.

Мочевина представляет собой полный амид угольной кислоты. Хотя мочевина и нейтральна на лакмус, но с кислотами она образует соли, причем азотнокислая и щавелевокислая соли мочевины характерны своей плохой растворимостью.

При гидролизе мочевина распадается на углекислый газ и аммиак:



Гидролиз мочевины протекает под действием фермента уреазы, содержащейся в некоторых бактериях и растениях.

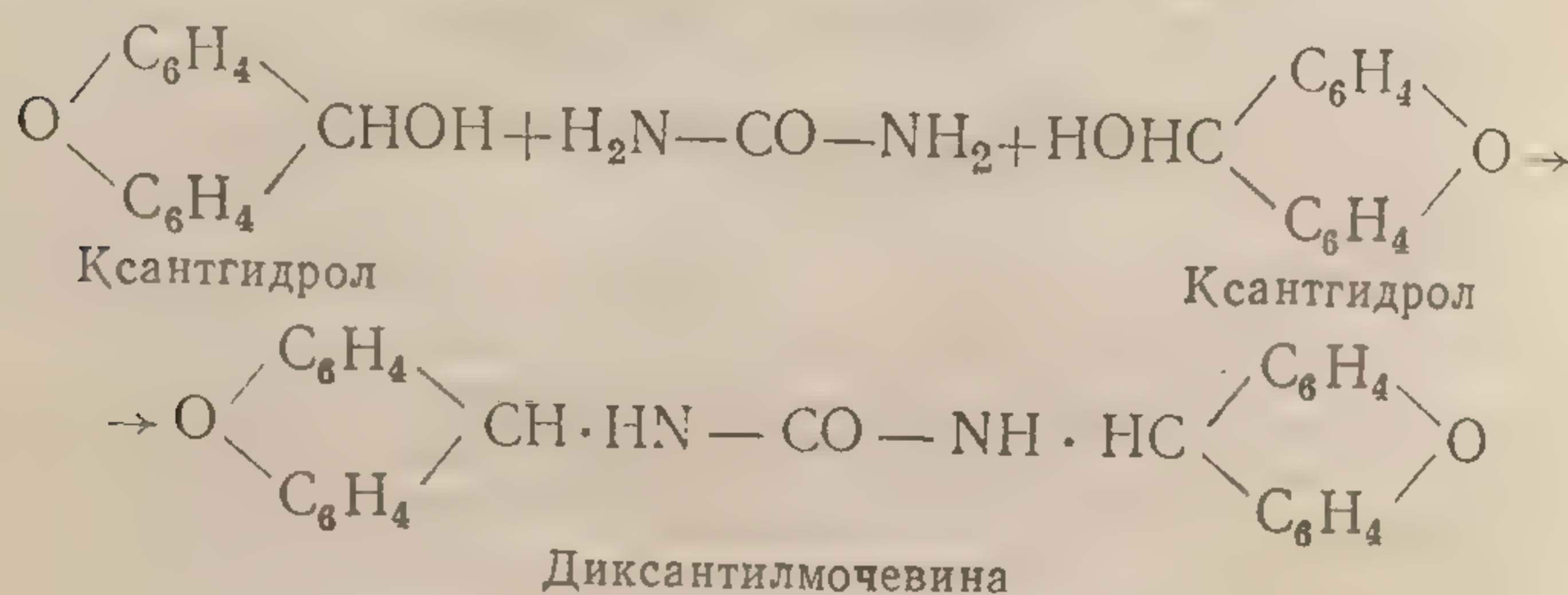
Действием уреазы бактерий объясняется аммиачный запах постоявшей мочи (аммиачное брожение). Гидролиз мочевины можно произвести и нагреванием со щелочами.

При нагревании в сухом виде мочевина теряет аммиак и образует биурет, который может быть обнаружен биуретовой реакцией (см. стр. 9), а также другие продукты.

Окислители расщепляют мочевину с выделением свободного азота.

Эта реакция (с бромноватистой щелочью в качестве окислителя) была применена А. П. Бородиным для количественного определения мочевины в моче (стр. 195).

Очень чувствительной пробой на мочеви́ну, также применяемой для количественного определения, является реакция, основанная на способности мочевины давать с ксантгидролом нерастворимое соединение — диксантилмочеви́ну:



П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.
2. Микроскоп.
3. Предметные и покровные стекла.
4. Пипетки.

Р е а к т и в ы. 1. Мочевина в кристаллах.
2. Мочевина, 3% раствор.
3. Мочевина, 0,1% раствор.
4. Азотная кислота, концентрированная.
5. Щавелевая кислота, насыщенный раствор.
6. Едкий натр, 10% раствор.
7. Лакмусовая бумажка, красная.
8. Сернокислая медь, 1% раствор.
9. Уксусная кислота, ледяная.
10. Ксантгидрол (синтез, см. стр. 325, п. 18), 5% раствор в метиловом спирте.

Х о д р а б о т ы

1. Получение азотнокислой мочевины

1. На предметное стекло помещают несколько кристалликов мочевины, прибавляют каплю воды и осторожно покачивают стекло до растворения мочевины.

2. Добавляют каплю азотной кислоты — образуются кристаллы азотнокислой мочевины. Закрывают их покровным стеклом и рассматривают под микроскопом при увеличении в 200—250 раз (рис. 21).

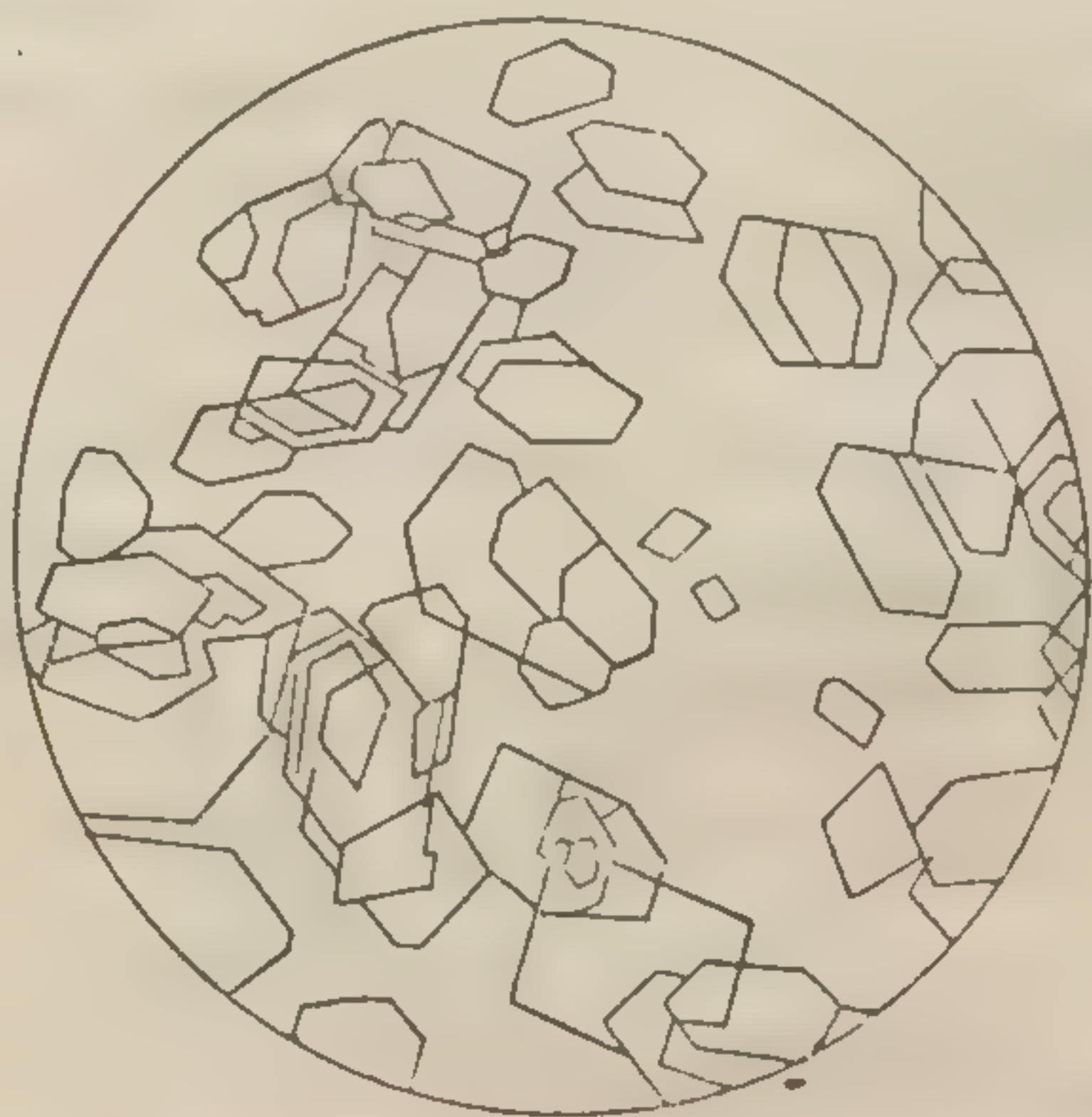


Рис. 21. Кристаллы азотнокислой мочевины.

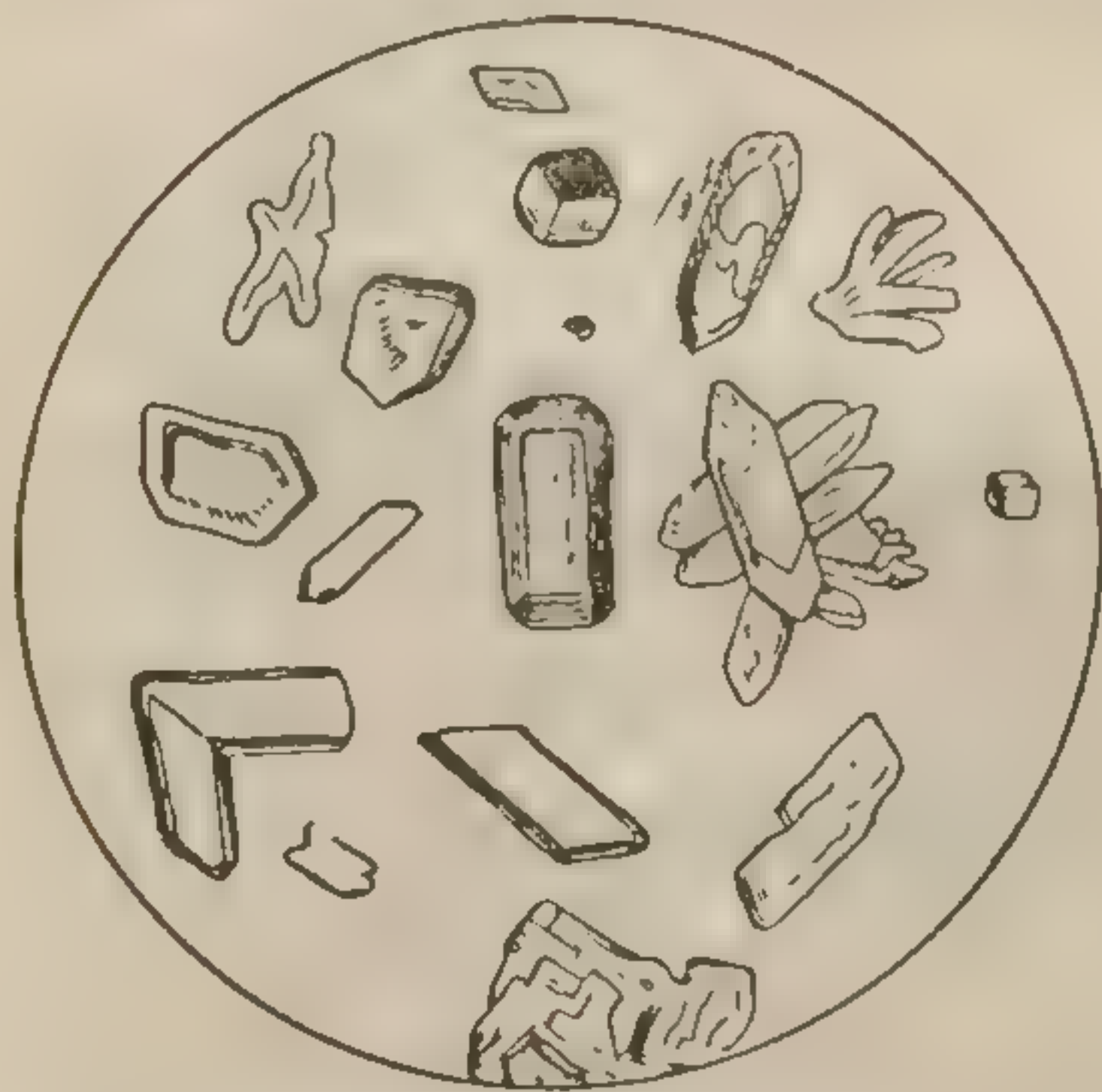


Рис. 22. Кристаллы щавелевокислой мочевины.

II. Получение щавелевокислой мочевины

1. Таким же образом получают кристаллы щавелевокислой мочевины, нанося на стекло раствор щавелевой кислоты вместо азотной.

2. Кристаллы рассматривают под микроскопом при увеличении около 50 раз (рис. 22).

III. Гидролиз мочевины

1. В пробирку наливают около 1 мл 3% раствора мочевины и добавляют равный объем раствора едкого натра.
2. Содержимое пробирки осторожно нагревают и кипятят. Происходит выделение аммиака, который обнаруживают по запаху и по посинению в парах лакмусовой бумажки, смоченной водой.

IV. Получение биурета

Получают из мочевины биурет и проделывают с ним биуретовую реакцию (см. стр. 9).

V. Реакция с ксантгидролом.

1. В пробирку наливают около 0,5 мл 0,1% раствора мочевины, прибавляют 1 мл уксусной кислоты и 0,1 мл

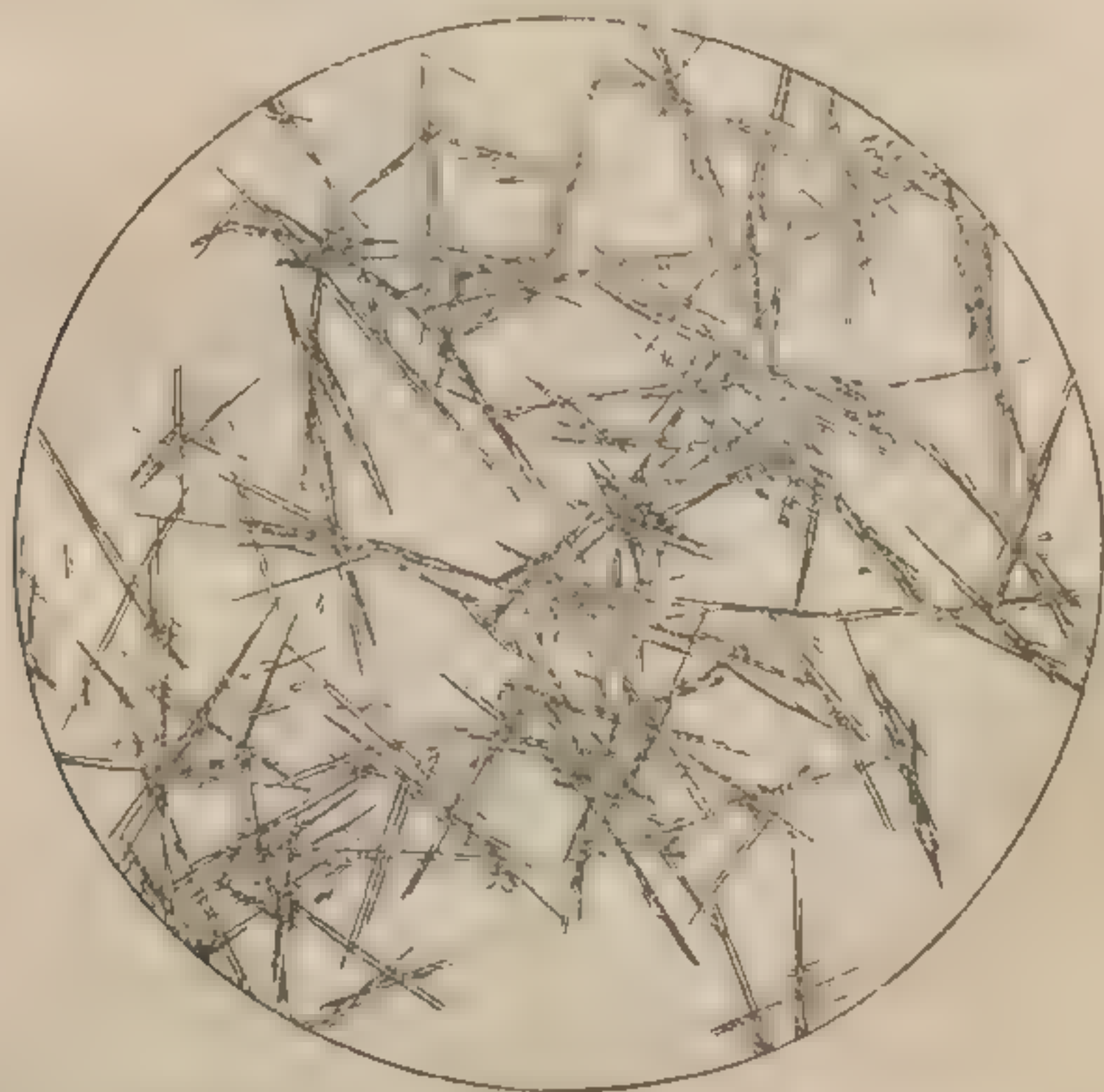


Рис. 23. Кристаллы диксантилмочевины.

(5—7 капель) раствора ксантгидрола и встряхивают. Через несколько минут выпадают кристаллы диксантилмочевины.

2. Полученные кристаллы в форме игл рассматривают под микроскопом при увеличении в 200—250 раз (рис. 23).

VI. Реакции на мочевины в моче

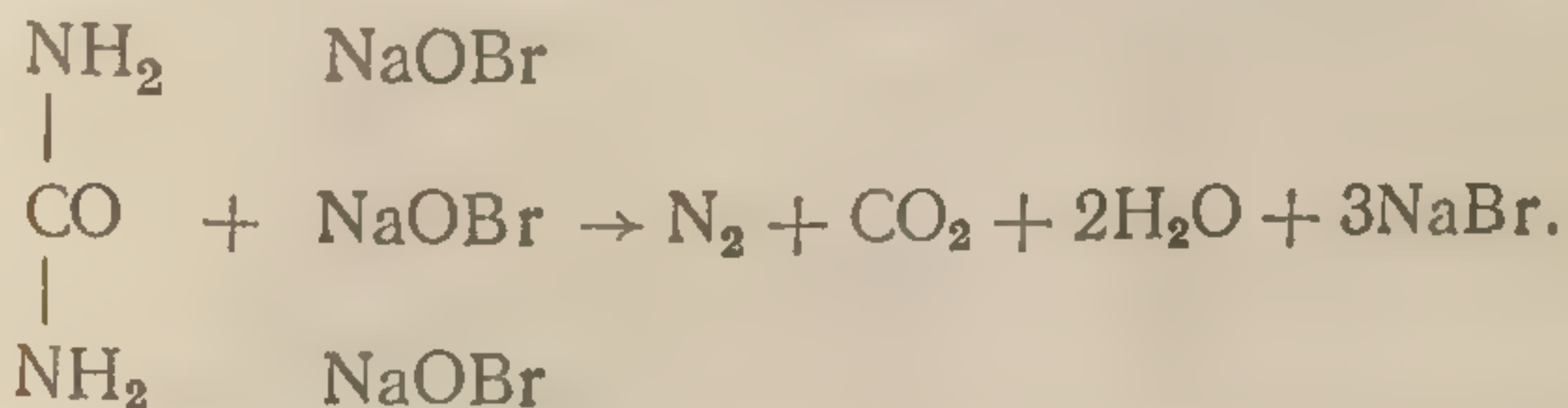
Гидролиз мочевины и реакцию с ксантгидролом (реакции III и V) проделывают с мочой.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЧЕВИНЫ В МОЧЕ ПО БОРОДИНУ

С мочой взрослого здорового человека за сутки выделяется около 30 г мочевины. Колебания в ту или другую сторону обычно зависят от состава и количества пищи. Кроме того, в патологических случаях количество мочевины в моче заметно повышается при лихорадке и уменьшается при некоторых заболеваниях печени.

Определение количества мочевины в случайной порции мочи не представляет клинического интереса, так как выделение ее с мочой происходит неравномерно. Поэтому необходимо учитывать количество мочевины, выделенное за сутки. Для этого собирают мочу, выделенную за 24 часа, измеряют ее количество и производят определение мочевины в порции суточной (смешанной) мочи.

Количественное определение мочевины в моче по способу А. П. Бородина основано на взаимодействии мочевины с бромноватистой щелочью (щелочным раствором бромноватистокислого натрия). Мочевина при этом разлагается с образованием азота и углекислого газа по схеме:



Образовавшийся углекислый газ связывается щелочью в виде углекислого натрия:



В этих условиях выделяется в виде газа только азот. Измеряют объем выделившегося азота, приводят его к нормальным условиям, т. е. к температуре 0° и давлению 760 мм; зная объем, вычисляют вес выделенного азота, а по количеству последнего узнают и вес мочевины.

Необходимо указать, что при определении мочевины по способу Бородина происходит выделение азота не только из мочевины, но отчасти и из креатинина, мочевой кислоты и некоторых других соединений. Кроме того, образуется немного окиси углерода, которая не поглощается щелочью. С другой стороны, из мочевины не полностью выделяется весь содержащийся в ней азот. В итоге противоположные ошибки до некоторой степени уравниваются и метод количественного определения мочевины в моче по Бородину достаточно точен для клинических исследований.

І. Определение в приборе Бородина

- П р и б о р ы.
1. Мерная колбочка на 50 мл.
 2. Пипетка на 5 мл.
 3. Пипетка на 10 мл.
 4. Ареометр для определения удельного веса мочи (урометр).
 5. Небольшой цилиндр, в который входит ареометр.
 6. Прибор А. П. Бородина (рис. 24).
 7. Барометр.
 8. Термометр.

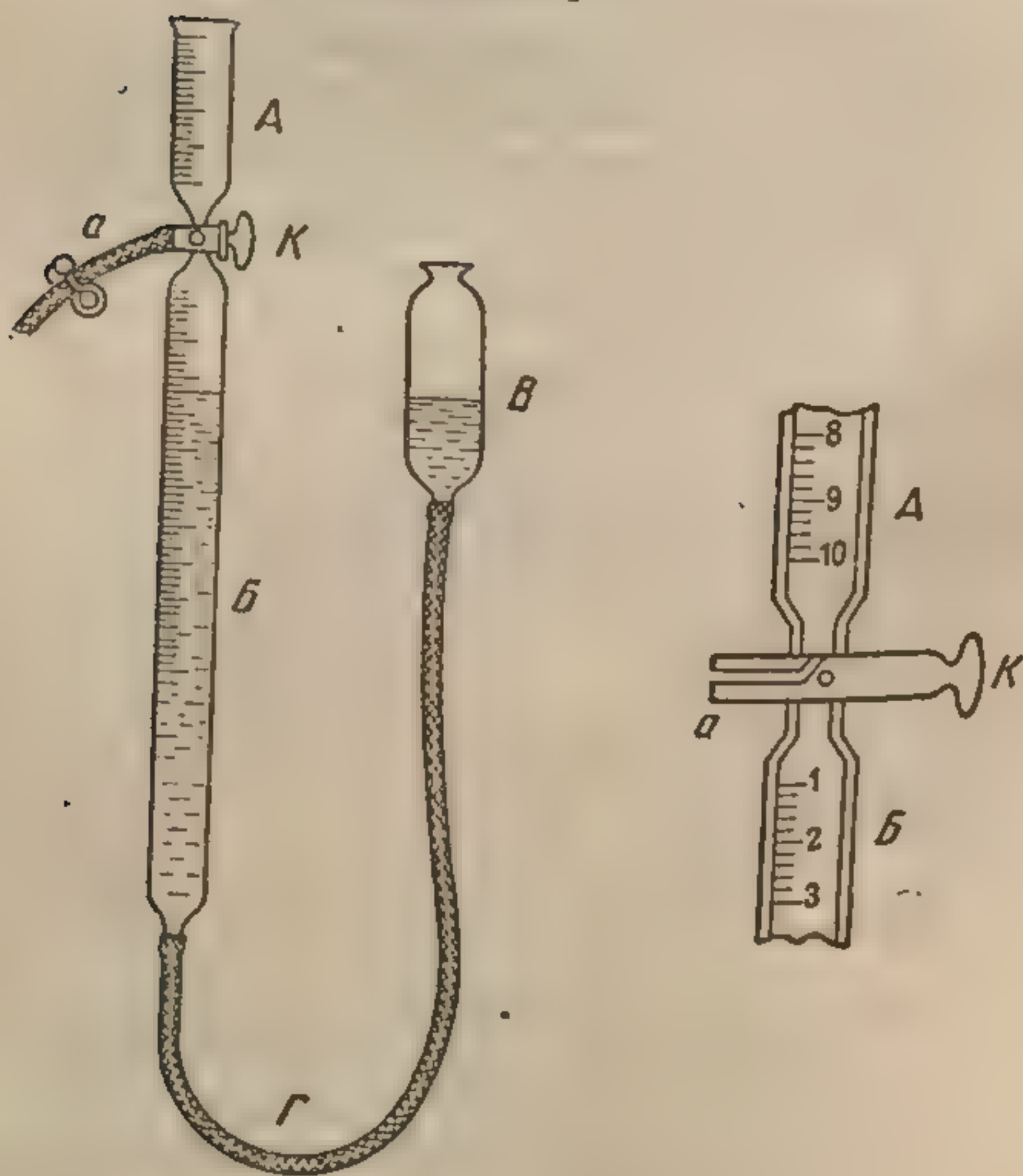


Рис. 24. Прибор А. П. Бородина для определения мочевины.

Прибор А. П. Бородина (рис. 24) состоит из стеклянной градуированной трубки АБ, более короткой и более широкой стеклянной трубки В и каучуковой трубки Г. Градуированная трубка АБ состоит из двух частей, между которыми находится стеклянный кран К, снабженный короткой каучуковой трубкой с зажимом. Как видно из рисунка, кран устроен так, что при одном его положении он соединяет А с Б, при другом — жидкость из А может вытечь наружу. Прибор Бородина должен быть укреплен на металлическом штативе.

- Р е а к т и в ы.
1. Соляная кислота, 2% раствор.
 2. Бромноватистокислый натрий (приготовление см. стр. 322, п. 5).
 3. Хлористый натрий, насыщенный раствор, подщелоченный углекислым натрием до слабо щелочной реакции на лакмус и отфильтрованный

Х о д р а б о т ы

1. Заполняют прибор Бородина насыщенным раствором хлористого натрия. Для этого раствор хлористого натрия вливают через трубку В, которая должна быть поднята кверху; кран при этом должен находиться в положении, при котором Б соединяется с А. Раствор хлористого натрия вливают до наполнения Б и частично А. Во время заполнения раствором хлористого натрия необходимо время от времени слегка сжимать каучуковую трубку Г, чтобы удалить из нее все пузырьки воздуха. Затем кран поворачивают и выводят раствор из А через каучуковую трубку, надетую на а, после чего закрывают зажим этой трубки.

2. Определяют в цилиндре с помощью ареометра удельный вес мочи и, если он выше 1,030, разводят исследуемую мочу в 10 раз, а если ниже — в 5 раз.

3. Ополаскивают А разведенной мочой, выпуская ее через отросток а. Эту операцию повторяют еще два раза, в результате чего трубка А полностью отмывается от попавшего в нее раствора хлористого натрия.

4. Зажимают зажим у конца а и наполняют трубку А разведенной мочой до нулевого деления, а трубку В опускают на более низкий уровень.

5. Поворачивают кран прибора и осторожно впускают в Б из А 5—8 мл разведенной мочи, снова закрывают кран и точно отмечают, сколько миллилитров мочи перешло из А

в *Б*. Так как удельный вес насыщенного раствора хлористого натрия значительно выше удельного веса разведенной мочи, то моча с раствором хлористого натрия не смешивается, а лишь наплаивается на него сверху.

6. Выпускают остаток мочи из трубки *А* через каучуковую трубку, надетую на кран, промывают трубку *А* водой и снова зажимают зажим.

7. Вливают теперь в трубку *А* раствор бромноватистокислого натрия, кран закрывают и выжидают конца выделения пузырьков газа.

8. Впускают 5—10 мл раствора бромноватистокислого натрия из *А* в *Б* и ждут, пока не перестанут выделяться пузырьки газа. Эту операцию приливания повторяют, и прекращают тогда, когда новое прибавление бромноватистокислого натрия уже не будет давать пузырьков газа. Необходимо следить за тем, чтобы уровень жидкости в *В* был ниже уровня жидкости в *Б* и чтобы в *А* все время ссавался бромноватистокислый натрий.

9. Оставляют аппарат на 20—30 минут, а затем легким постукиванием по трубке *Б* и по резиновой трубке собирают весь азот вверх трубки *Б*.

10. Приводят газ в трубке *Б* к атмосферному давлению, поднимая *В* так, чтобы уровень жидкости в нем был одинаков с уровнем в трубке *Б*, и измеряют объем азота, находящегося в трубке *Б*¹.

11. Записывают показания барометра и термометра и вычисляют содержание мочевины в суточном количестве исследуемой мочи.

Для этого сначала приводят объем азота к нормальным условиям и вычисляют его вес в миллиграммах (см. стр. 188). Найдя вес выделенного азота, переводят его в мочевины, умножая на 2,143 (молекулярный вес мочевины = 60,05, молекулярный вес азота = 28,02, откуда $60,05 : 28,02 = 2,143$). Полученное количество мочевины делят на количество миллилитров разведенной мочи в пробе, умножают на разведение и на суточное количество мочи.

Количество миллиграммов мочевины, соответствующее 1 мл выделенного азота при температуре и давлении опыта, можно найти из табл. 5 (стр. 200).

¹ Как только определение закончено, прибор необходимо вымыть, так как при долгом стоянии щелочь может разъесть стекло и испортить краны.

Количе

Содерж

где *v* — об
a — количе
при темпер
b — разведе
(диурез); *n*
взятое для
миллиграмм

Для оп
родина "Л
прибор, ко
ратории.

Рис. 25.
Л. М. Кра
для опр
моче

Количество мочевины, выделенное за сутки =

$$= \frac{v \cdot a \cdot b \cdot D}{n}.$$

Содержание мочевины в моче в процентах =

$$= \frac{v \cdot a \cdot b \cdot 100}{1000 n},$$

где v — объем выделившегося азота в условиях опыта;
 a — количество мочевины, соответствующее 1 мг азота при температуре и давлении опыта (находят по табл. 5);
 b — разведение; D — количество мочи, выделенной за сутки (диурез); n — количество миллилитров разведенной мочи, взятое для определения; 1000 — фактор для перевода миллиграммов в граммы.

II. Определение в приборе Краснянского

Для определения мочевины в моче по способу А. П. Бородинна Л. М. Краснянским предложен более доступный прибор, который может быть легко собран в любой лаборатории.

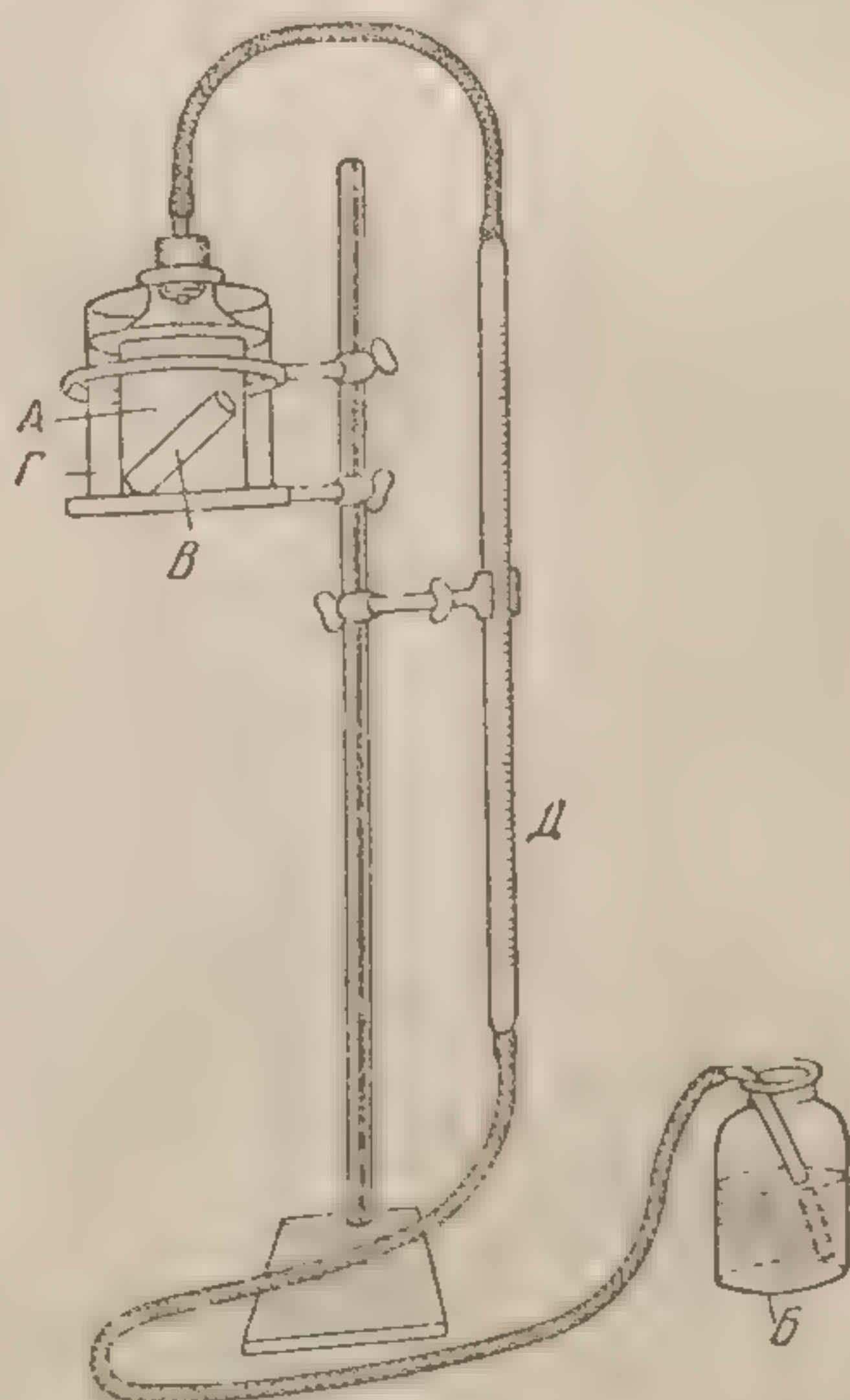


Рис. 25. Прибор
Л. М. Краснянского
для определения
мочевины.

Таблица 5

Количество миллиграммов мочевины, эквивалентное 1 мл азота, собранного над водой при давлении P и температуре t° (по П. Л. Мальчевскому)

$t^\circ \backslash P$	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748
12	2,443	2,446	2,449	2,453	2,456	2,459	2,463	2,466	2,470	2,473	2,476	2,480	2,483	2,486
13	2,431	2,435	2,438	2,441	2,445	2,448	2,451	2,455	2,458	2,461	2,465	2,468	2,472	2,475
14	2,420	2,423	2,426	2,430	2,433	2,437	2,440	2,443	2,447	2,450	2,453	2,457	2,460	2,463
15	2,408	2,412	2,415	2,418	2,422	2,425	2,428	2,432	2,435	2,438	2,442	2,445	2,448	2,452
16	2,397	2,400	2,403	2,407	2,410	2,413	2,417	2,420	2,423	2,427	2,430	2,433	2,437	2,440
17	2,385	2,389	2,391	2,395	2,398	2,402	2,405	2,408	2,412	2,415	2,418	2,422	2,425	2,428
18	2,373	2,377	2,380	2,383	2,387	2,390	2,393	2,397	2,400	2,403	2,406	2,410	2,413	2,416
19	2,362	2,365	2,368	2,371	2,375	2,378	2,381	2,385	2,388	2,391	2,394	2,398	2,401	2,404
20	2,350	2,353	2,356	2,360	2,363	2,366	2,369	2,373	2,376	2,379	2,383	2,386	2,390	2,392
21	2,338	2,341	2,344	2,347	2,351	2,354	2,357	2,360	2,364	2,367	2,370	2,374	2,377	2,380
22	2,325	2,329	2,332	2,335	2,338	2,342	2,345	2,348	2,352	2,355	2,358	2,361	2,365	2,368
23	2,313	2,316	2,320	2,323	2,326	2,329	2,333	2,336	2,339	2,342	2,346	2,349	2,352	2,355
24	2,301	2,304	2,307	2,311	2,314	2,317	2,320	2,323	2,327	2,330	2,333	2,336	2,340	2,343

Таблица 5 (продолжение)

$t^\circ \backslash P$	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762
12	2,490	2,493	2,496	2,500	2,503	2,507	2,510	2,513	2,517	2,521	2,523	2,527	2,530	2,533
13	2,478	2,482	2,485	2,488	2,492	2,495	2,498	2,502	2,505	2,509	2,512	2,515	2,519	2,522
14	2,467	2,470	2,473	2,477	2,480	2,483	2,487	2,490	2,493	2,497	2,500	2,504	2,507	2,510
15	2,455	2,458	2,462	2,465	2,468	2,471	2,475	2,478	2,482	2,485	2,488	2,492	2,495	2,498
16	2,443	2,447	2,450	2,453	2,457	2,460	2,463	2,467	2,470	2,473	2,477	2,480	2,483	2,486
17	2,431	2,435	2,438	2,441	2,445	2,448	2,451	2,455	2,458	2,461	2,465	2,468	2,471	2,474
18	2,420	2,423	2,426	2,430	2,433	2,436	2,439	2,443	2,446	2,449	2,453	2,456	2,459	2,462
19	2,408	2,411	2,414	2,417	2,421	2,424	2,427	2,431	2,433	2,437	2,440	2,444	2,447	2,450
20	2,396	2,399	2,402	2,405	2,409	2,412	2,415	2,419	2,422	2,425	2,428	2,432	2,435	2,438
21	2,383	2,387	2,390	2,393	2,396	2,400	2,403	2,406	2,409	2,413	2,416	2,419	2,423	2,426
22	2,371	2,374	2,378	2,381	2,384	2,387	2,391	2,394	2,397	2,400	2,404	2,407	2,410	2,413
23	2,359	2,362	2,365	2,368	2,371	2,375	2,378	2,381	2,384	2,387	2,391	2,394	2,397	2,401
24	2,346	2,349	2,352	2,356	2,359	2,362	2,365	2,369	2,372	2,375	2,378	2,382	2,385	2,388

Таблица 5

Количество миллиграммов мочевины, эквивалентное 1 мл азота, собранного над водой при давлении P и температуре t° (по П. Л. Мальчевскому)

$t^\circ \backslash P$	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748
12	2,443	2,446	2,449	2,453	2,456	2,459	2,463	2,466	2,470	2,473	2,476	2,480	2,483	2,486
13	2,431	2,435	2,438	2,441	2,445	2,448	2,451	2,455	2,458	2,461	2,465	2,468	2,472	2,475
14	2,420	2,423	2,426	2,430	2,433	2,437	2,440	2,443	2,447	2,450	2,453	2,457	2,460	2,463
15	2,408	2,412	2,415	2,418	2,422	2,425	2,428	2,432	2,435	2,438	2,442	2,445	2,448	2,452
16	2,397	2,400	2,403	2,407	2,410	2,413	2,417	2,420	2,423	2,427	2,430	2,433	2,437	2,440
17	2,385	2,389	2,391	2,395	2,398	2,402	2,405	2,408	2,412	2,415	2,418	2,422	2,425	2,428
18	2,373	2,377	2,380	2,383	2,387	2,390	2,393	2,397	2,400	2,403	2,406	2,410	2,413	2,416
19	2,362	2,365	2,368	2,371	2,375	2,378	2,381	2,385	2,388	2,391	2,394	2,398	2,401	2,404
20	2,350	2,353	2,356	2,360	2,363	2,366	2,369	2,373	2,376	2,379	2,383	2,386	2,390	2,392
21	2,338	2,341	2,344	2,347	2,351	2,354	2,357	2,360	2,364	2,367	2,370	2,374	2,377	2,380
22	2,325	2,329	2,332	2,335	2,338	2,342	2,345	2,348	2,352	2,355	2,358	2,361	2,365	2,368
23	2,313	2,316	2,320	2,323	2,326	2,329	2,333	2,336	2,339	2,342	2,346	2,349	2,352	2,355
24	2,301	2,304	2,307	2,311	2,314	2,317	2,320	2,323	2,327	2,330	2,333	2,336	2,340	2,343

Таблица 5 (продолжение)

$P \backslash t^\circ$	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762
------------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Таблица 5 (продолжение)

$t^\circ \backslash P$	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762
12	2,490	2,493	2,496	2,500	2,503	2,507	2,510	2,513	2,517	2,521	2,523	2,527	2,530	2,533
13	2,478	2,482	2,485	2,488	2,492	2,495	2,498	2,502	2,505	2,509	2,512	2,515	2,519	2,522
14	2,467	2,470	2,473	2,477	2,480	2,483	2,487	2,490	2,493	2,497	2,500	2,504	2,507	2,510
15	2,455	2,458	2,462	2,465	2,468	2,471	2,475	2,478	2,482	2,485	2,488	2,492	2,495	2,498
16	2,443	2,447	2,450	2,453	2,457	2,460	2,463	2,467	2,470	2,473	2,477	2,480	2,483	2,486
17	2,431	2,435	2,438	2,441	2,445	2,448	2,451	2,455	2,458	2,461	2,465	2,468	2,471	2,474
18	2,420	2,423	2,426	2,430	2,433	2,436	2,439	2,443	2,446	2,449	2,453	2,456	2,459	2,462
19	2,408	2,411	2,414	2,417	2,421	2,424	2,427	2,431	2,433	2,437	2,440	2,444	2,447	2,450
20	2,396	2,399	2,402	2,405	2,409	2,412	2,415	2,419	2,422	2,425	2,428	2,432	2,435	2,438
21	2,383	2,387	2,390	2,393	2,396	2,400	2,403	2,406	2,409	2,413	2,416	2,419	2,423	2,426
22	2,371	2,374	2,378	2,381	2,384	2,387	2,391	2,394	2,397	2,400	2,404	2,407	2,410	2,413
23	2,359	2,362	2,365	2,368	2,371	2,375	2,378	2,381	2,384	2,387	2,391	2,394	2,397	2,401
24	2,346	2,349	2,352	2,356	2,359	2,362	2,365	2,369	2,372	2,375	2,378	2,382	2,385	2,388

Таблица 5 (продолжение)

t° \ P	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776
12	2,537	2,540	2,543	2,549	2,550	2,554	2,557	2,561	2,564	2,567	2,571	2,575	2,577	2,581
13	2,525	2,529	2,532	2,535	2,539	2,542	2,545	2,549	2,552	2,556	2,559	2,562	2,566	2,569
14	2,514	2,517	2,520	2,524	2,527	2,530	2,534	2,537	2,540	2,544	2,547	2,550	2,554	2,557
15	2,502	2,505	2,508	2,512	2,515	2,518	2,522	2,525	2,528	2,532	2,535	2,538	2,542	2,545
16	2,490	2,493	2,496	2,500	2,503	2,506	2,510	2,513	2,516	2,520	2,523	2,526	2,530	2,533
17	2,478	2,481	2,484	2,488	2,491	2,494	2,498	2,501	2,504	2,508	2,511	2,514	2,518	2,521
18	2,466	2,469	2,472	2,476	2,479	2,482	2,485	2,489	2,492	2,495	2,499	2,502	2,505	2,509
19	2,454	2,457	2,460	2,464	2,467	2,471	2,473	2,477	2,480	2,483	2,486	2,490	2,493	2,496
20	2,441	2,445	2,448	2,451	2,454	2,458	2,461	2,464	2,468	2,471	2,474	2,477	2,481	2,484
21	2,429	2,432	2,436	2,439	2,442	2,445	2,449	2,452	2,455	2,458	2,462	2,465	2,468	2,471
22	2,417	2,420	2,423	2,426	2,430	2,433	2,436	2,439	2,443	2,446	2,449	2,452	2,456	2,459
23	2,404	2,417	2,410	2,414	2,417	2,420	2,423	2,427	2,430	2,433	2,436	2,440	2,443	2,446
24	2,391	2,394	2,398	2,401	2,404	2,407	2,411	2,414	2,417	2,420	2,423	2,426	2,430	2,433

1. В
со стек
2. С
стокисл
в склян
3. Н
таким
точно о
4. З
нагрева
пробкой
5. С
подстав
6. П
склянке
весь вод
завая 1
7. Бе
от руки)

Рез

Пр

Приборы 1. Прибор Л. М. Краснянского (рис. 25). Прибор состоит из бюретки *Д* с вытянутым верхним концом, широкогорлой склянки *А* емкостью 100—150 мл, второй широкогорлой склянки *Б* на 200—250 мл и широкого стакана *Г*. Верхний конец бюретки соединен каучуковой трубкой и пробкой со склянкой *А*, в которую вложена обрезанная пробирка *В*. Нижний конец бюретки снабжен каучуковой трубкой со стеклянным наконечником, вложенным в склянку *Б*. Эта каучуковая трубка, стеклянный наконечник и склянка *Б* на $\frac{3}{4}$ заполнены водой.

2. Пипетка на 1 мл.
3. Мерный цилиндр на 25 мл.
4. Воронка.
5. Барометр.
6. Термометр.

Реактивы. Бромноватистокислый натрий (приготовление см. стр. 322, п. 5).

Ход работы

1. Вынимают пробку из склянки *А* и снимают ее вместе со стаканом *Г* с верхней подставки прибора.

2. Отмеривают цилиндром 15 мл раствора бромноватистокислого натрия и осторожно через воронку наливают его в склянку *А*, не попадая в пробирку.

3. На верхнюю подставку ставят склянку *Б*, поднимая таким образом уровень воды в бюретке. В пробирку *В* точно отмеряют пипеткой 1 мл исследуемой мочи.

4. Завертывают склянку *А* в полотенце (чтобы она не нагревалась от руки) и плотно закрывают ее резиновой пробкой, соединенной каучуковой трубкой с бюреткой.

5. Ставят склянку *Б* на стол, а склянку *А* на верхнюю подставку прибора, таким образом меняя их места.

6. Поднимают склянку *Б* и, держа ее так, чтобы вода в склянке и в бюретке была на одном уровне, записывают уровень воды в бюретке. Склянку *Б* снова ставят на стол, создавая тем самым некоторое разрежение в системе.

7. Берут склянку *А* за пробку (чтобы не нагреть склянку от руки) и, наклонив ее, заставляют мочу вылиться в рас-

твор бромноватистой щелочи, при этом раствор должен попасть также и в пробирку. В результате реакции выделяется газообразный азот. Взбалтывание производят несколько раз, после чего склянку А ставят в стакан Г с небольшим количеством воды комнатной температуры (реакция экзотермическая и необходимо охлаждение до комнатной температуры) и устанавливают на верхнюю подставку прибора.

8. Через 10—15 минут снова находят уровень воды в бюретке (п. 6).

9. Повторяют операции, описанные в пп. 7—8 до тех пор, пока уровень воды в бюретке не будет постоянным.

Увеличение объема газа в приборе соответствует объему выделившегося азота.

10. Находят по табл. 5 (стр. 200) количество мочевины в миллиграммах, соответствующее (при данном барометрическом давлении и температуре) одному миллилитру азота и множат эту величину на объем выделившегося азота.

Так как азот выделился из 1 мл мочи, то 100 мл мочи содержат в 100 раз больше мочевины, а суточное количество во столько раз больше, сколько миллилитров было в суточной моче (см. также стр. 198, п. 11).

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АММИАКА В МОЧЕ

В организме человека аммиак, образованный при дезаминировании аминокислот, частично расходуется на нейтрализацию кислот и выделяется из организма с мочой в виде аммонийных солей. Оставшийся после нейтрализации избыток аммиака превращается в печени в мочевины.

Таким образом, в моче всегда имеется некоторое количество аммиака, связанного с кислотами (серной, соляной, фосфорной, щавелевой и др.), в виде солей аммония. Свободный аммиак в норме в моче не встречается.

При смешанной пище у человека в сутки с мочой выделяется от 0,5 до 1,2 г аммиака в виде солей аммония. Выделение последних уменьшается при поражении почек и при растительной пище. Наоборот, выделение аммонийных солей с мочой увеличивается при заболеваниях печени, длительной лихорадке, диабете, раке, при потреблении большого количества мяса и в некоторых других случаях.

Повышенное количество аммонийных солей в моче указывает на накопление

в организме и выделение с мочой повышенного по сравнению с нормой количества кислот (ацидоз).

Метод количественного определения аммиака в моче основан на вытеснении аммиака из его солей содой и последующей отгонке свободного аммиака с током воздуха в приемник, содержащий определенное количество титрованной кислоты. Аммиак связывается кислотой в приемнике, а избыток кислоты затем оттитровывается щелочью. Зная количество кислоты, пошедшей на связывание аммиака, можно вычислить количество аммиака, выделенного из мочи.

Во избежание вспенивания при перегонке аммиака, в мочу добавляют керосин, а в целях уменьшения растворимости аммиака в моче и, следовательно, более быстрой отгонки аммиака, в мочу добавляется еще хлористый натрий.

Приборы. 1. Установка для отгонки аммиака (рис. 26). Промывная склянка *В* должна быть на $\frac{1}{3}$ наполнена 10% серной кислотой. U-образные трубки *Г* и *Б* наполняются ватой.

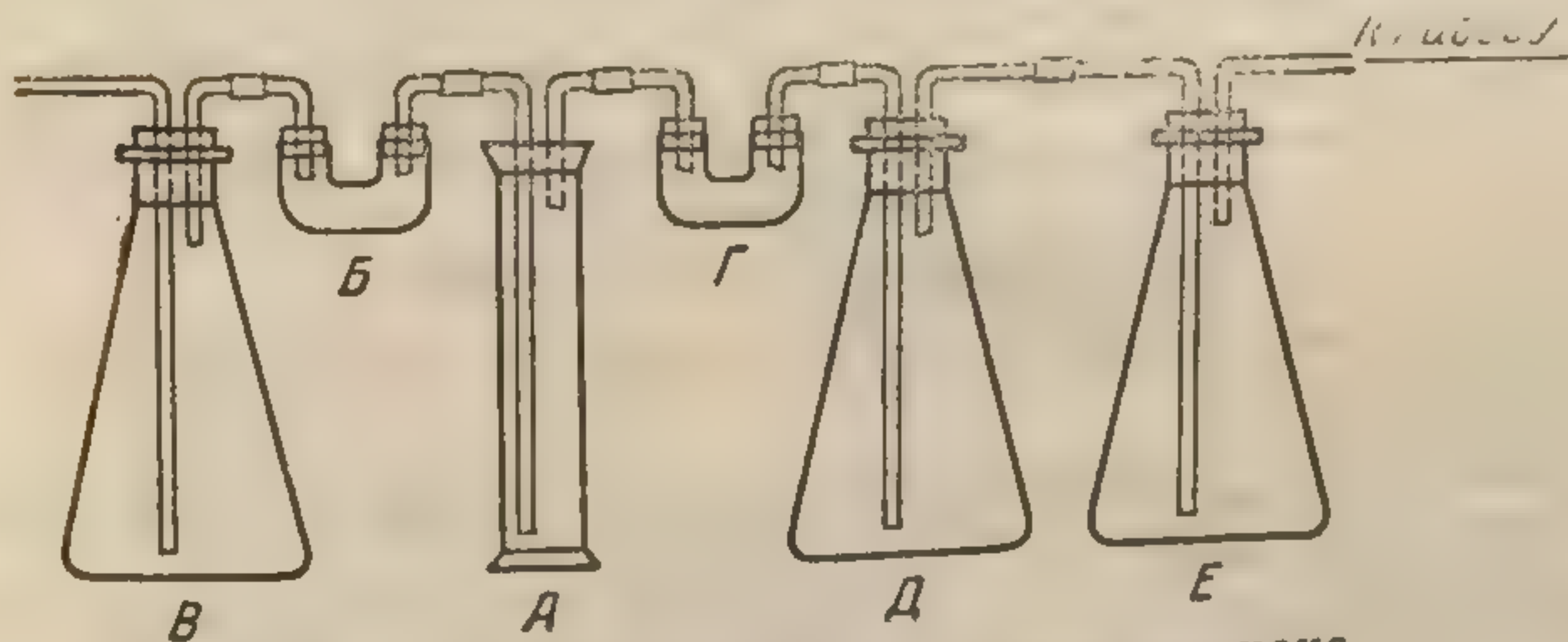


Рис. 26. Установка для отгонки аммиака.

2. Бюретка.
3. Пипетка на 25 мл.

Реактивы. 1. Едкий натр, 0,1 н. раствор.
2. Метиловый красный 0,1% раствор в спирте.
3. Керосин.
4. Серная кислота, 0,1 н. раствор.
5. Углекислый натрий, в порошке.
6. Хлористый натрий, в порошке.

Ход работы

1. Наливают из бюретки в приемные колбы *Е* и *Д* по 25 мл 0,1 н. серной кислоты, добавляют в каждую колбу по 100 мл дистиллированной воды и по 5 капель метилового красного.

2. Наливают в цилиндр *А* 25 мл мочи, прибавляют 5 г хлористого натрия, 1—2 мл керосина и 10 г соды.

3. Быстро собирают подготовленную заранее установку для отгонки аммиака и пускают в ход водоструйный насос.

4. Производят просасывание воздуха в течение 1½ часов. Разбирают прибор. Количественно соединяют содержимое колб *Е* и *Д* и оттитровывают 0,1 н. щелочью до желтой окраски.

5. Вычисляют количество граммов аммиака в 100 мл исследуемой мочи по формуле:

$$x = (a - b) \cdot 0,0017 \cdot 4,$$

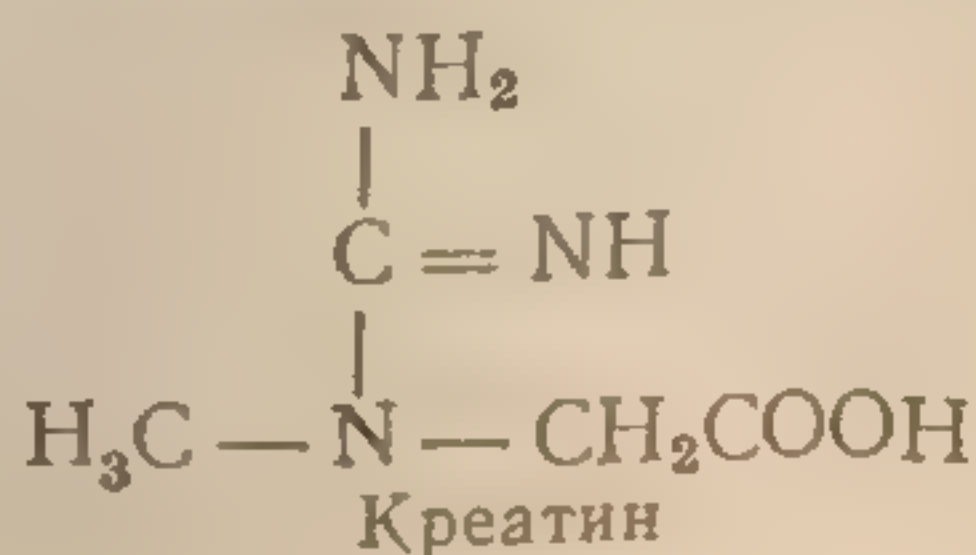
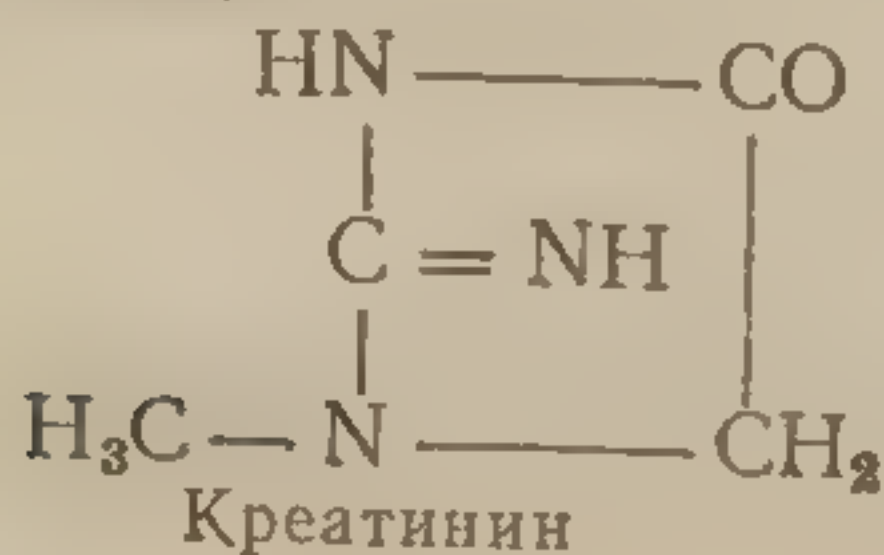
где *a* — количество миллилитров 0,1 н. серной кислоты, прилитой в обе приемные колбы *Е* и *Д*; *b* — количество миллилитров 0,1 н. щелочи, пошедшей на титрование остатка кислоты в приемных колбах; 0,0017 — количество граммов аммиака, соответствующее 1 мл 0,1 н. серной кислоты; 4 — коэффициент пересчета на 100 мл мочи.

Зная суточное количество мочи и содержание аммиака в 100 мл мочи, вычисляют его количество в суточной моче.

РЕАКЦИИ НА КРЕАТИНИН

Креатинин является нормальной составной частью мочи человека.

Обладая слабо выраженными восстановительными свойствами, креатинин восстанавливает гидрат окиси меди в щелочной среде. В отличие от действия сахаров закись меди образуется при этом лишь при продолжительном кипячении, а щелочной раствор висмута вообще не восстанавливается. С минеральными кислотами креатинин легко образует соли, хотя в свободном виде дает нейтральную реакцию на лакмус.



Креатин
продуктов
креатин
кислоты

В моче к
вой кисл
сидом н
с пикрино

ного пикрат
мочи с неск
риновой ки

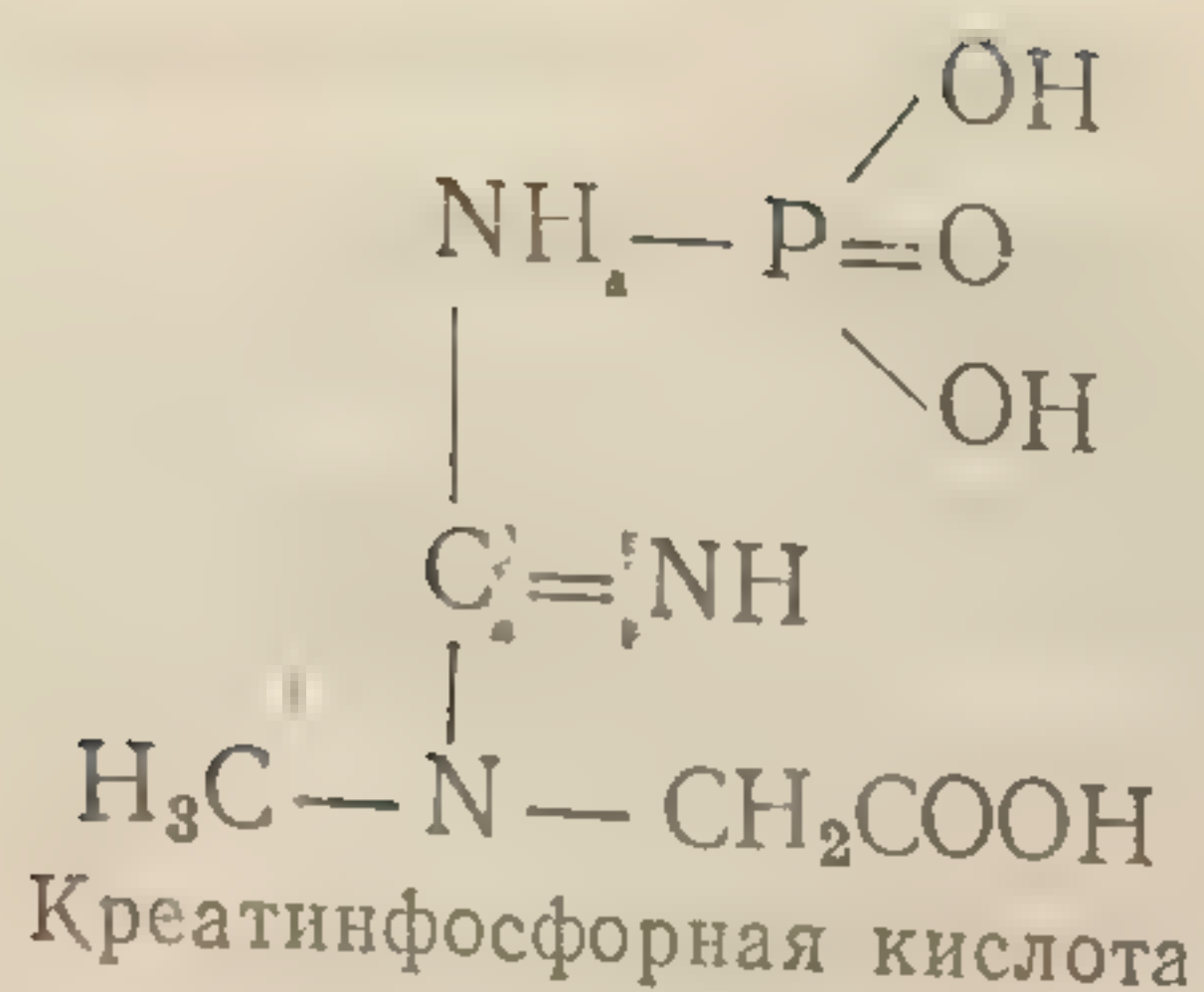
При подк
каплями ра
NO] образу

ретае крас
Подкислени
ление желт

Прибл

Реакт

К 1—2 м
кого патра
Получается



Креатинин является одним из конечных азотистых продуктов обмена. Он является ангидридом креатина и образуется из креатинфосфорной кислоты.

В моче креатинин обнаруживается реакциями с пикриновой кислотой (реакция Яффе) или с нитропруссидом натрия (реакция Вайля). Химизм реакции с пикриновой кислотой заключается в образовании красного пикрата креатинина при подщелачивании и смешивании мочи с несколькими каплями насыщенного раствора пикриновой кислоты.

При подщелачивании и смешивании мочи с несколькими каплями раствора нитропруссид натрия $\text{Na}_2 [\text{Fe} (\text{CN})_5 \text{NO}]$ образуется изонитрозокреатинин. Жидкость приобретает красную окраску, переходящую затем в желтую. Подкисление раствора уксусной кислотой ускоряет появление желтой окраски жидкости.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. 1. Пикриновая кислота, насыщенный раствор (12 г в 1 л).
 2. Едкий натр, 10% раствор,
 3. Нитропруссид натрия, 3% раствор, свежеприготовленный.
 4. Уксусная кислота, 5% раствор.

Ход работы

1. Реакция с пикриновой кислотой

К 1—2 мл мочи прибавляют 5—6 капель раствора едкого натра и 3—4 капли раствора пикриновой кислоты. Получается оранжевая окраска.

II. Реакция с нитропруссидом

К 1—2 мл мочи прибавляют 5—6 капель раствора едкого натра и 3—4 капли свежеприготовленного раствора нитропруссиды. Жидкость окрашивается в красный цвет, который затем постепенно переходит в желтый. При подкислении уксусной кислотой красная окраска сейчас же исчезает и переходит в желтую. Последнее обстоятельство отличает реакцию на креатинин от аналогичной реакции на ацетон (см. стр. 113), при которой красная окраска не исчезает от подкисления уксусной кислотой.

ОБНАРУЖЕНИЕ КРЕАТИНА В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Креатин и креатинфосфорная кислота (стр. 207) являются важными экстрактивными веществами мышечной ткани. Присутствие креатина обнаруживают в безбелковом фильтрате, переводя креатин в креатинин нагреванием с соляной кислотой и производя, далее, реакцию на креатинин с пикриновой кислотой.

Приборы. 1. Штатив с пробирками.
2. Воронка с фильтром.
3. Пипетка на 5 мл с делениями.
4. Водяная баня.
5. Маленький цилиндр.
6. Стеклянная палочка.

Реактивы. 1. Свежая мышечная кашица (приготовление см. стр. 326, п. 24).
2. Сульфосалициловая кислота, 20% раствор.
3. Соляная кислота, 10% раствор.
4. Пикриновая кислота, насыщенный раствор.
5. Едкий натр, 15% раствор.

Ход работы

1. Помещают в пробирку около 0,5 г мышечной кашицы, добавляют 2 мл дистиллированной воды и хорошо перемешивают содержимое стеклянной палочкой.

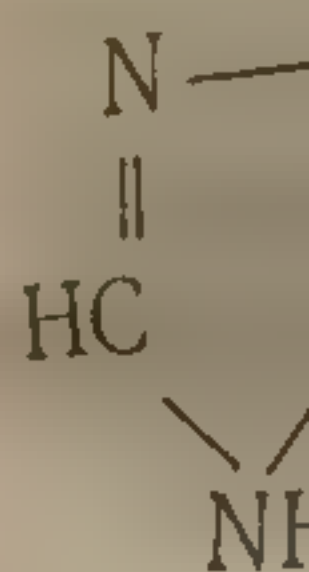
2. Продолжая перемешивать, осаждают белки добавлением 2 мл раствора сульфосалициловой кислоты.

3. Отфильтровывают осадок белка.

4. Отме
к нему 1 м
баню на 2
5. Выни
1 мл раств
натра (из
Наблю

ОБНАР

Карноз
β-аланина



Карноз
вичем.

Имида
тивом, да

При

Реак

1. Оса
ровывают
п. 1—3).

Можно
обнаружен

14 Практику

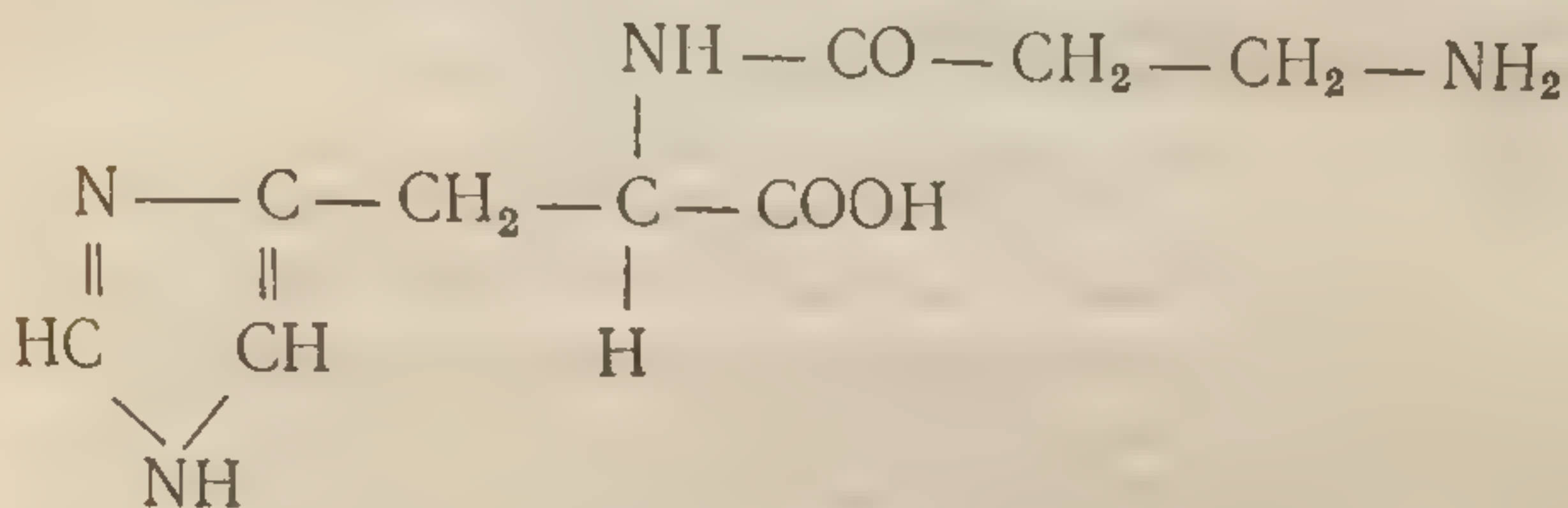
4. Отмеривают в пробирку 1 мл фильтрата, добавляют к нему 1 мл соляной кислоты и ставят в кипящую водяную баню на 2 часа. При этом креатин переходит в креатинин.

5. Вынимают пробирку из водяной бани, добавляют в нее 1 мл раствора пикриновой кислоты и 2 мл раствора едкого натра (из маленького цилиндра).

Наблюдают характерное оранжевое окрашивание.

ОБНАРУЖЕНИЕ КАРНОЗИНА В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Карнозин представляет собой дипептид гистидина и β-аланина (β-аланил-гистидин):



Карнозин

Карнозин был открыт в мясном экстракте В. С. Гулевичем.

Имидазольное кольцо карнозина реагирует с диазореактивом, давая оранжево-красное производное.

П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.

2. Воронка.

3. Пипетка на 5 мл с делениями.

Р е а к т и в ы. 1. Свежая мышечная кашица (приготовление см. стр. 326, п. 24).

2. Сульфосалициловая кислота, 20% раствор.

3. Диазореактив (приготовление см. стр. 323, п. 14).

4. Углекислый натрий, 10% раствор.

Х о д р а б о т ы

1. Осаждают белки в 0,5 г мышечной кашицы и отфильтровывают от осадка (см. обнаружение креатина, стр. 208, п. 1—3).

Можно пользоваться одним и тем же фильтратом для обнаружения как креатина, так и карнозина.

2. Отмеривают в пробирку 0,5 мл безбелкового фильтрата мышечной кашицы, добавляют 1 мл диазореактива и 2 мл раствора соды.

Наблюдают оранжево-красное окрашивание.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРЕАТИНИНА И КРЕАТИНА В МОЧЕ

Количество креатинина, выделяемого с мочой взрослых людей в течение суток, обычно колеблется в пределах 1,5—2,4 г. Повышение количества креатинина в моче наблюдается при усиленной мышечной работе, при лихорадочном состоянии и некоторых других заболеваниях.

Креатин в нормальной моче взрослого человека не содержится. Креатинурия наступает в случаях, связанных с усиленным распадом тканей, например, при послеродовой инволюции матки. Моча детей всегда содержит как креатин, так и креатинин.

Количественное определение креатинина в моче производится колориметрическим методом (см. стр. 118).

Количественный метод определения креатинина в моче основан на реакции с пикриновой кислотой (см. стр. 207). Если эту реакцию провести в строго определенных условиях, то, сравнивая в колориметре интенсивность полученной окраски исследуемого раствора с окраской стандартного раствора, можно определить количество креатинина в исследуемой моче.

Ацетон и ацетоуксусная кислота, а также большие количества сахара влияют на окраску, поэтому определение креатинина в моче больных диабетом может быть неточным.

Количество креатина в моче вычисляют по разности между суммой креатина и креатинина и количеством креатинина. Для этого мочу кипятят с соляной кислотой, чтобы количественно перевести креатин в креатинин; далее, определяют колориметрически общий креатинин (сумму креатина и креатинина) и собственно креатинин (в порции мочи, не подвергшейся кипячению). Разность умножают на 1,16 (молекулярный вес креатина равен 131, молекулярный вес креатинина — 113, т. е. коэффициент пересчета будет равен $\frac{131}{113} = 1,16$). В итоге получаем цифру, выражающую количество креатина в исследуемой моче.

1. Определение креатинина

- П р и б о р ы. 1. Колориметр.
2. Мерные колбочки на 50 мл, 2 шт.
3. Пипетка на 1 мл.
4. Пипетка на 2 мл с делениями.

- Р е а к т и в ы. 1. Креатинин, стандартный раствор, содержащий 1 мг в 1 мл, или стандартный раствор двуххромовокислого калия (приготовление см. стр. 323, п. 13).
2. Пикриновая кислота, 1,2% раствор.
3. Едкий натр, 10% раствор.

Х о д р а б о т ы

1. Наливают в одну мерную колбочку на 50 мл 1 мл стандартного раствора креатинина. В другую мерную колбочку на 50 мл наливают 1 мл исследуемой мочи.

2. Прибавляют в обе колбочки по 1 мл раствора щелочи и по 1,5 мл раствора пикриновой кислоты, слегка взбалтывают колбочки и оставляют стоять на 5 минут.

3. Доводят дистиллированной водой до метки и, закрыв пробками, тщательно перемешивают содержимое каждой колбочки.

4. Колориметрируют испытуемый раствор по стандарту и вычисляют количество креатинина по формуле:

$$x = \frac{1 \cdot h_1}{h_2},$$

где x — количество миллиграммов креатинина в 1 мл исследуемой мочи; 1 — количество миллиграммов креатинина в 1 мл стандартного раствора; h_1 — толщина слоя жидкости стандартного раствора; h_2 — толщина слоя жидкости исследуемого раствора (с мочой).

Если нет химически чистого креатинина, то пользуются стандартным раствором двуххромовокислого калия. Опыт установлено, что окраска слоя этого раствора высотой в 8 мм равна по интенсивности окраске, получаемой при реакции с 1 мг креатинина при толщине слоя жидкости в 8,1 мм.

Поэтому при пользовании в качестве стандарта раствором двуххромовокислого калия толщину его слоя устанавливают в 8 мм, что соответствует 8,1 мм стандарта креати-

нина. Поскольку такой постоянный стандарт уже окрашен, его наливают непосредственно в левый стаканчик колориметра. Для получения точных результатов толщина слоя испытуемого раствора должна быть в пределах от 5 до 13 мм.

Допустим, толщина слоя исследуемой жидкости равна 10,3 мм. Толщина слоя раствора бихромата равна 8 мм. В этом случае содержание креатинина в 1 мл исследуемой мочи равно:

$$\frac{1 \cdot 8,1}{10,3} = 0,786 \text{ мг.}$$

II. Определение креатина

- П р и б о р ы.
1. Колориметр.
 2. Мерные колбочки на 50 мл, 3 шт.
 3. Пипетка на 10 мл.
 4. Пипетка на 5 мл.
 5. Пипетка на 1 мл.
 6. Пипетка на 2 мл с делениями.
 7. Коническая колбочка с обратным холодильником.
 8. Стаканчик.
 9. Водяная баня.

- Р е а к т и в ы.
1. Креатинин, стандартный раствор, содержащий 1 мг в 1 мл или стандартный раствор двуххромовокислого калия (приготовление см. стр. 323, п. 13).
 2. Пикриновая кислота, 1,2% раствор.
 3. Едкий натр, 10% раствор.
 4. Соляная кислота, 1 н. раствор.
 5. Едкий натр, 1 н. раствор.

Х о д р а б о т ы

1. Отмеривают в коническую колбочку 10 мл исследуемой мочи и 5 мл нормального раствора соляной кислоты.
2. Закрывают колбочку пробкой с вставленным в нее обратным холодильником, пускают в него воду и нагревают содержимое колбочки в продолжение 3 часов в кипящей водяной бане.

3. Закрывают холодильник, содержимое колбочки переносят в мерную колбочку на 50 мл, ополаскивают коническую колбочку 2—3 раза небольшими порциями воды и сливают в мерную колбочку.

4. Добавляют в мерную колбочку 5 мл нормального раствора едкого натра для нейтрализации кислоты, доводят водой до метки, закрывают пробкой и тщательно перемешивают; 5 мл полученной жидкости соответствуют 1 мл исходной мочи.

5. В три мерные колбочки на 50 мл отмеривают: в первую — 5 мл жидкости из колбочки, в которой производилась обработка мочи кислотой (для определения суммы креатина и креатинина). Во вторую — 1 мл мочи (для определения собственно креатинина) и в третью — 1 мл стандартного раствора креатинина.

6. Во все три колбочки добавляют по 1 мл 10% раствора щелочи и по 1,5 мл раствора пикриновой кислоты. Перемешивают, оставляют стоять на 5 минут, доводят дистиллированной водой до метки, закрывают пробками, снова перемешивают и колориметрируют (см. определение креатинина, стр. 211).

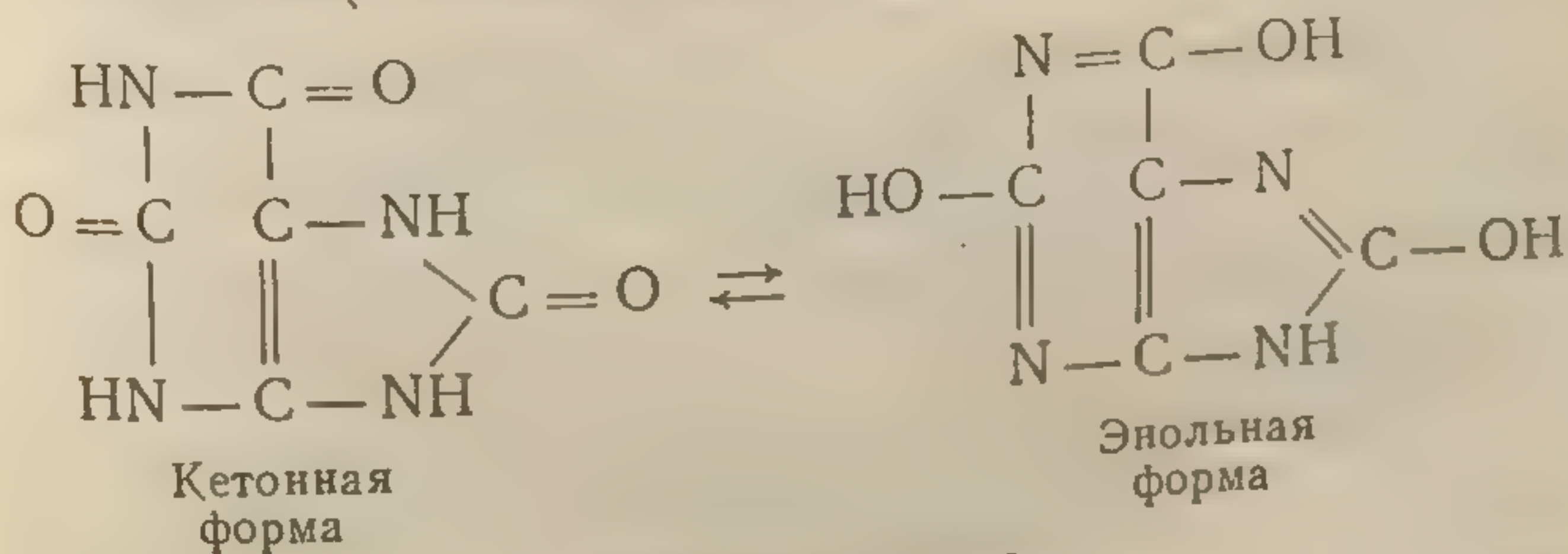
7. Из результата определения суммы креатина и креатинина вычитают количество собственно креатинина.

Полученную разницу умножают на 1,16.

МОЧЕВАЯ КИСЛОТА

Мочевая кислота образуется в организме при окислении пуринов и является 2-6-8-триоксипурином.

Мочевая кислота существует в виде двух таутомерных форм: лактамной (кетонной) и лактимной (энольной).



Мочевая кислота

Мочевая кислота в чистом виде представляет собой белый кристаллический порошок, очень трудно растворимый в воде.

При выделении из мочи мочевая кислота образует многообразные кристаллы (рис. 27), всегда захватывает пигменты и окрашена в оранжево-желтый цвет. Являясь слабой двухосновной кислотой, мочевая кислота дает средние и кислые соли. Последние осе-



Рис. 27. Кристаллы мочевой кислоты.

бенно плохо растворимы в воде. Некоторые соли мочевой кислоты, например, соли лития, и некоторых органических оснований, более растворимы.

У человека в норме в тканях и жидкостях обычно содержится очень мало мочевой кислоты, а с мочой ее выделяется около 0,6 г за сутки.

Количество выделяемой мочевой кислоты в значительной мере зависит от диеты. При пище, богатой пуринами, выделение ее повышается, доходя до 2 г в сутки; если пуринов в пище мало (малобелковая или безбелковая диета) суточное выделение мочевой кислоты может снижаться до 0,2—0,4 г.

Много мочевой кислоты выделяется при усиленном распаде нуклеопротеидов (например, при лейкомии). При подагре мочевой кислоты выделяется меньше, чем в норме, но

содержание ее в крови сильно повышено; в различных тканях тела, особенно в суставах, отлагается мочева́я кислота и ее соли, причиня́я боль.

I. Выделение мочево́й кислоты из мочи

При подкислении мочи трудно растворима́я мочева́я кислота выпадает в осадок, окрашенный в темнобу́рый цвет, вследствие примеси пигментов мочи.

Кристаллы мочево́й кислоты обычно прочно оседают на стенках и дне сосуда.

П р и б о р ы. 1. Стакан.
2. Микроскоп.
3. Воронка.
4. Коническая колба.

Р е а к т и в ы. 1. Моча.
2. Соляная кислота, концентрированная.

Х о д р а б о т ы

1. Наливают в стакан около 200 мл мочи, подкисляют ее 2—10 мл концентрированной соляной кислоты и оставляют в холодном месте на сутки или более (до следующего занятия).

2. Отфильтровывают осадок, сливая мочу на фильтр. Приставшие к стенкам и дну сосуда кристаллы мочево́й кислоты соскабливают и присоединяют к отфильтрованному осадку.

3. Полученные кристаллы рассматривают под микроскопом (рис. 27); их можно использовать также для реакций на мочево́ую кислоту (см. ниже).

II. Реакции на мочево́ую кислоту

Мочева́я кислота обладает восстанавливающей способностью и дает положительную реакцию Троммера только при продолжительном кипячении, в отличие от глюкозы, которая восстанавливает окись меди уже при нагревании до начала кипения. Щелочного раствора висмута мочева́я кислота не восстанавливает.

Наиболее характерная проба на мочево́ую кислоту — это так называемая м у р е к с и д н а я р е а к ц и я; она производится следующим образом.

Небольшое количество мочевой кислоты обливают в фарфоровой чашечке концентрированной азотной кислотой, которую затем выпаривают. Остаток окрашивается в коричнево-красный цвет. Если его растворить в аммиаке, то раствор приобретает красивое пурпурное окрашивание, благодаря образованию аммонийной соли пурпурной кислоты (мурексида).

Свое название эта реакция получила потому, что окраска получаемого раствора похожа на очень ценимую в древности пурпурную краску, которая добывалась из моллюска мурекс (багрянка). Производное мочевой кислоты — мурексид химически не имеет ничего общего с пурпуром древних, который представляет собой бромпроизводное индиго.

П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.

2. Фарфоровая чашечка.

Р е а к т и в ы. 1. Мочевая кислота.

2. Едкий натр, 10% раствор.

3. Сернокислая медь, 5% раствор.

4. Азотная кислота, концентрированная.

5. Аммиак, 25% раствор.

Х о д р а б о т ы

1. Помещают несколько кристалликов мочевой кислоты в пробирку, прибавляют туда дистиллированной воды и нагревают. Заметного растворения не происходит.

Добавляют около 1 мл раствора едкого натра, продолжают нагревать и отмечают растворение мочевой кислоты в щелочи.

2. Несколько кристалликов мочевой кислоты помещают в пробирку, добавляют 2—3 мл раствора едкого натра и по каплям раствора сернокислой меди до образования зеленовато-голубой мути мочекислородной окиси меди. Слегка нагревают и отмечают образование белого осадка мочекислородной закиси меди. Добавляют еще несколько капель раствора сернокислой меди, кипятят верхний слой жидкости и наблюдают образование красного осадка закиси меди.

3. 1—2 кристаллика мочевой кислоты обливают в фарфоровой чашечке несколькими каплями крепкой азотной кислоты и осторожно досуха выпаривают на голом огне (под тягой). По остывании красный или желтый остаток (аллоксантин) смачивают аммиаком. Получается красивое пурпурное окрашивание.

КРОВЬ

Через кровь ткани получают кислород и продукты питания, а в кровь они выделяют углекислый газ и продукты обмена¹.

Содержание отдельных составных частей крови довольно постоянно. Изменения, даже небольшие, в составе крови отражаются на состоянии организма, и обратно, заболевания приводят к изменению состава крови. Вот почему определение количества ряда составных частей крови имеет большое диагностическое и прогностическое значение.

Анализ крови широко применяется в клинике и дает врачу важные сведения о состоянии больного, характере заболевания и его течении.

Кровь при повреждении сосудов организма свертывается. Свертывание крови представляет собой сложный ферментативный процесс, биологически очень важный для сохранения жизни при ранениях и кровотечениях.

Кровь человека и позвоночных животных состоит из кровяной плазмы (последняя содержит 90—91% воды и 9—10% сухих веществ) и так называемых форменных элементов — эритроцитов (красные кровяные тельца), лейкоцитов (белые кровяные тельца) и тромбоцитов (красные пластинки).

* СВЕРТЫВАНИЕ КРОВИ

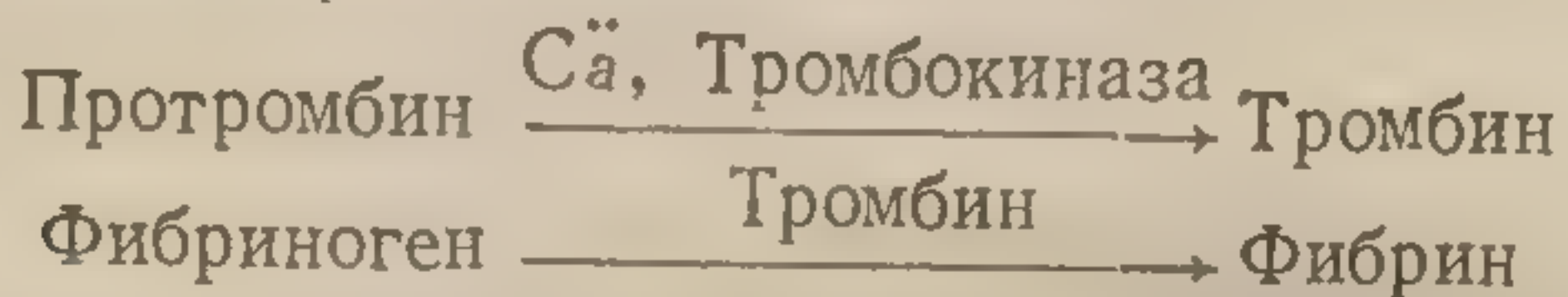
Вне кровеносных сосудов кровь свертывается, застывая в сгусток. Сгусток состоит из фибрина, выпадающего из кровяной плазмы в виде волокон, которые постепенно сокращаются, захватывая форменные элементы крови и отжимая желтоватую кровяную сыворотку. Различные патологические процессы нарушают свертыва-

¹ Дыхательная функция крови в норме и патологии изучалась С. Е. Севериным, Г. Е. Владимировым и др.

ние крови. Пониженная свертываемость крови, например, при гемофилии, приводит к внутренним и наружным кровотечениям. Повышенная свертываемость может вызвать образование сгустков (тромбов) и внутри кровеносных сосудов.

Свертывание крови представляет собой очень сложный процесс, в котором важную роль играют ферментативные реакции. Детали этого процесса все еще остаются неясными. В общих чертах он сводится к следующему.

В плазме крови растворен белок фибриноген. Под действием фермента тромбина фибриноген превращается в нерастворимый фибрин. Фибрин, выпадая в виде нитей, захватывает форменные элементы крови и образует сгусток. Фермент тромбин образуется в крови из неактивного профермента — протромбина (тромбогена) под действием ионов кальция и тромбокиназы.



Таким образом, для свертывания крови необходимо наличие как тромбокиназы, так и ионов кальция. Тромбокиназа представляет собой липопротеид. Она содержится в клетках всех тканей, но особенно много тромбокиназы в тромбоцитах (кровяных пластинках). Когда кровь находится внутри кровеносных сосудов, она не свертывается, так как там нет активного тромбина. При повреждении ткани и тромбоцитов выделяется тромбокиназа, и происходит свертывание крови. Необходимо отметить, что образование протромбина в организме возможно лишь при участии витамина К.

Различные вещества (антикоагулянты), действующие на тот или иной этап описанного выше сложного процесса, нарушают свертывание крови. Так, щавелево-кислые и фтористые соли осаждают кальций, а лимоннокислые соли образуют с кальцием прочный комплекс. Под действием этих агентов концентрация ионов кальция в плазме крови снижается и свертывание становится невозможным. Гирудин (вещество, выделяемое слюнными железами пиявок) предотвращает свертывание крови, действуя на тромбин. Гепарин (слож-

ный поли-
крови. Ге-
повидимо-
близиру-
обнаруже-
антигеп-
или гепа-
При

Реа

Для п-
танного
20 мл кр-
той, смоч-
обтирают
бирают

279

1. Соб-
ее дерев-
канчика.
2. Вен-
3. Пр-
Через
локон фи-
Кровь
фибри-
к сверт-

II. П

Кровь
личестве
левокисло-

ный полисахарид) действует на разные этапы свертывания крови. Гепарин содержится во всех тканях организма и, повидимому, играет важную физиологическую роль, стабилизируя кровь от свертывания внутри организма. В крови обнаружен также особый парализатор свертывания крови — а н т и т р о м б и н. Антитромбин, повидимому, является или гепарином или очень близким к нему веществом.

П р и б о р ы. 1. Скальпель или игла от шприца.
2. Стаканчик на 50 мл.
3. Деревянная палочка.

Р е а к т и в ы. 1. Ксилол.
2. Бюкс, в который отвешено 10 мг щавелевокислого калия.
3. Бюкс, в который отвешено около 1 мг гепарина или гирудина.

Х о д р а б о т ы

Для производства исследования необходимо иметь упитанного здорового кролика, от которого легко получить 20 мл крови. Для взятия крови ухо кролика протирают ватой, смоченной ксилолом, смывают ксилол теплой водой, обтирают ухо сухой ватой, делают укол в ушную вену и собирают кровь.

I. Выделение фибрина и получение дефибринированной крови

1. Собирают в стаканчик 10—15 мл крови и перемешивают ее деревянной палочкой, стараясь не касаться стенок стаканчика.

2. Вену кролика зажимают кусочком ваты и зажимом.

3. Продолжают перемешивать кровь.

Через несколько минут начинает выделяться в виде волокон фибрин, который наматывают на палочку.

Кровь, из которой удален фибрин, носит название дефибринированной: такая кровь уже не способна к свертыванию.

II. Предотвращение свертывания крови действием щавелевокислого калия

Кровь от того же кролика продолжают собирать в количестве около 5 мл в бюкс, содержащий около 10 мг щавелевокислого калия. Кровь в бюксе все время перемешивают.

Свертывания крови не происходит, вследствие осаждения ионов кальция.

III. Предотвращение свертывания крови действием на нее гепарина или гирудина

От другого упитанного здорового кролика собирают до 10 мл крови в бюкс, в который отвешено около 1 мг гепарина или гирудина, и перемешивают.

Свертывания крови не наблюдается, так как гепарин мешает образованию тромбина, а гирудин тормозит взаимодействие тромбина с фибриногеном.

* ОПРЕДЕЛЕНИЕ СКОРОСТИ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Свертывание крови может замедляться при некоторых заболеваниях. При гемофилии кровь оказывается совсем лишенной способности к свертыванию и в этом случае небольшая рана грозит человеку смертью от кровотечения.

В клинике перед операцией весьма важно знать, какова скорость свертывания крови у больного.

Для определения скорости свертывания крови необходимо, чтобы взятие крови не сопровождалось травмой форменных элементов и не имело места внесение в кровь посторонних веществ.

Кровь здорового человека свертывается через 5—6 минут, если определение скорости свертывания производят излагаемым ниже способом. При других способах определения скорости свертывания получаются несколько отличные результаты, что зависит от неодинаковых условий, при которых исследуется кровь (температура и пр.).

П р и б о р ы. 1. Игла для взятия крови.

2. Вата.

3. Марля.

4. Водяная баня.

5. Термометр.

6. Часовое стекло.

7. Вытянутая стеклянная палочка с шариком на конце.

8. Секундомер.

Р е а к т и в ы. 1. Этиловый спирт.

2. Диэтиловый эфир.

1. Беру
и помещаю
ее ставя
(30°). Мом
меру.

2. Чере
стеклянно
как бы з

3. Мою
каждые по

4. Зас
ниточки ф

Этот моме

5. Отм
крови, что

* ОП

Протро
и содержи
Образова
личии дос
тромбокин
в тромбин
и превращ

Количе
щее значе
шательств
бозов спе
разовани
ганизма

Принци
на том, что
бокиназы
жания в

Мы пр
тромбина
пластина)
цина пре
меняется

Ход работы

1. Берут из мякоти пальца каплю крови (см. стр. 78) и помещают ее на часовое стекло, которое возможно быстрее ставят на предварительно нагретую водяную баню (30°). Момент взятия крови точно фиксируют по секундомеру.

2. Через 1 минуту производят в капле крови с помощью стеклянной палочки спиралеобразные движения, стремясь как бы захватить каплю крови.

3. Моют стеклянную палочку, обсушивают ее и через каждые полминуты повторяют операции, описанные в п. 2.

4. Засекают по секундомеру время получения первой ниточки фибрина на вынутой из крови стеклянной палочке. Этот момент считается началом свертывания крови.

5. Отмечают момент образования сплошного сгустка крови, что считают концом свертывания крови.

* ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТРОМБИНА ПО БОРОВСКОЙ И РОВИНСКОЙ

Протромбин (тромбоген) является глюкопротеидом и содержится в глобулиновой фракции белков крови. Образование протромбина происходит в печени при наличии достаточного количества витамина К. Под влиянием тромбокиназы и ионов кальция протромбин превращается в тромбин. Тромбин в свою очередь действует на фибриноген и превращает его в фибрин.

Количественное определение протромбина имеет большое значение в случаях, когда требуется оперативное вмешательство в области брюшной полости, при лечении тромбозов специальными препаратами, препятствующими образованию тромбов, при авитаминозе К, перегревании организма и в некоторых других случаях.

Принцип определения содержания протромбина основан на том, что в присутствии определенного количества тромбокиназы скорость свертывания крови зависит от содержания в ней протромбина.

Мы приводим наиболее простой способ определения протромбина. В качестве источника тромбокиназы (тромбопластина) используется антирабическая вакцина (эта вакцина представляет собой эмульсию мозга кролика и применяется против бешенства). Если скорость свертывания

крови нормального человека принять за единицу, то относительная скорость свертывания крови больного, в определенных условиях, служит показателем содержания протромбина в крови.

Низкое содержание протромбина понижает свертываемость крови и вызывает геморрагии. Чаще всего низкое содержание протромбина в крови обусловлено недостатком витамина К. При достаточном содержании витамина К в пище оно может быть показателем заболеваний печени.

Приборы. 1. Маленький стаканчик с притертой пробкой.

2. Штатив с маленькими (микробиологическими) пробирками.

3. Предметные стекла, хорошо обезжиренные.

4. Микропипетки сухие на 0,1 мл, 3 шт.

5. Микропипетка на 0,2 мл.

6. Стеклянные палочки.

7. Игла для взятия крови.

8. Вата.

9. Марля.

10. Секундомер.

Реактивы. 1. Антирабическая вакцина.

2. Этиловый спирт.

3. Диэтиловый эфир.

4. Иодная настойка.

Ход работы

1. В маленький стаканчик выливают содержимое ампулы.

2. В маленькую пробирку отмеривают микропипеткой 0,1 мл вакцины и 0,2 мл дистиллированной воды. Смесь тщательно взбалтывают. Получается разведение вакцины в три раза.

3. Наносят на предметное стекло каплю разведенной антирабической вакцины (при повторении исследования все капли вакцины должны быть по возможности одинаковой величины).

4. Берут кровь из безымянного пальца левой руки здорового человека (у которого содержание протромбина в крови принимают за норму) (см. стр. 78). Первую высту-

павшую каплю крови стирают сухой марлей, и дают появиться новым каплям, которые набирают в микропипетку.

5. Одну каплю крови помещают на предметное стекло рядом с каплей вакцины. Капля крови должна быть в непосредственной близости от капли вакцины и по размеру несколько превышать последнюю (при повторном исследовании все капли крови должны быть одинаковой величины).

6. Стеклой палочкой соединяют капли вакцины и крови на предметном стекле и одновременно пускают в ход секундомер. Предметное стекло кругообразно покачивают (жидкость должна перемешиваться, но не расплываться по стеклу) до выпадения желтобразного сгустка (в присутствии антирабической вакцины сгусток обычно образуется сразу, без предварительного выпадения отдельных волокон фибрина). Время появления сгустка засекают по секундомеру.

7. Повторяют еще 1—2 раза описанную выше операцию с п. 3. Если на образование сгустка от момента смешения капель в среднем идет от 20 до 40 секунд, то разведение вакцины удобно для определения. Если время свертывания меньше 20 секунд, то готовят большее разведение вакцины. Если время превышает 40 секунд — вакцину разводят не в 3, а в 2 раза.

8. Повторяют определение (с п. 3) с той же вакциной, беря кровь больного (исследуемого).

Следует помнить, что вакцина из разных ампул может дать разные результаты. Поэтому стандартизацию (на здоровом субъекте) и определение у больного необходимо проводить с вакциной из одной и той же ампулы.

При клиническом исследовании стандартизацию вакцин обычно проводят, пользуясь кровью нескольких здоровых лиц и беря среднее время свертывания.

Время свертывания крови исследуемого лица делят на время свертывания контрольной (нормальной) крови и получают показатель протромбина. Если, например, время свертывания контрольной (нормальной) крови составляет 30 секунд, а время свертывания крови больного 45 секунд, то показатель протромбина, равный 1,5, указывает на пониженное содержание протромбина. Показатель протромбина ниже единицы встречается очень редко и указывает на повышенное содержание протромбина в крови.

• ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЩЕЛОЧНОГО РЕЗЕРВА КРОВЯНОЙ ПЛАЗМЫ

Концентрация водородных ионов в крови поддерживается на практически постоянном уровне при $pH = 7,4$. Колебания активной кислотности крови в норме не превышают сотых долей водородного показателя. Такое постоянство pH обусловлено в первую очередь наличием в крови буферных систем.

Главным механизмом, удерживающим pH крови на практически постоянном уровне, является карбонатная буферная система; другие буферные системы крови — фосфатная, оксигемоглобиновая, гемоглобиновая и белковая — играют меньшую роль. При образовании кислот в организме и попадании их в кровь кислоты вытесняют из бикарбоната углекислоту, которая, как известно, является очень слабой кислотой и сдвигает pH крови лишь незначительно. Поскольку диссоциация угольной кислоты подавляется присутствующим в крови бикарбонатом, то сдвиг pH крови в кислую сторону еще менее выражен.

Отсюда следует, что чем больше в крови бикарбоната, т. е. чем больше углекислоты могут связать щелочи, находящиеся в крови, тем больше буферная емкость крови и, следовательно, способность ее удерживать постоянную концентрацию водородных ионов.

Несмотря на большую буферную емкость крови, в ней тем не менее имеют место небольшие сдвиги pH . Такие малейшие сдвиги pH крови в кислую сторону вызывают рефлекторное учащение дыхания и усиленное выделение CO_2 с выдыхаемым воздухом. Помимо выдыхания углекислого газа, сдвиги pH крови компенсируются также выделением избытка кислот и щелочей через почки с мочой и окислением органических кислот в организме.

Кроме регуляции кислотно-щелочного равновесия в организме и поддержания постоянного уровня pH , способность кровяной плазмы связывать углекислоту (так называемый «щелочной резерв») играет огромную роль в дыхательной функции крови. В тканях при более высоком парциальном давлении углекислоты кровь связывает CO_2 в виде бикарбонатов. В легких при более низком парциальном давлении углекислоты и более высоком

парциальности
кислоты
Щелочной
ной щелочной
зываются
углекислоты
миллиграмм
влении
ратуре
может
кровяной
атмосферы
щей 5,5
ствует парциаль
углекислоты
ной крови
воздухе).
вается щелочной
бикарбоната
часть CO_2
растворенной
плазма крови
объемных
от 52 до 65
на 100 мл
щелочного
признаком
преобладают
лот, который
этом с мочой
ных солей
ной резерв
калоз —
ацидоз —
низме щелоч
этом выделя
щелочных
кислот.
Щелочной
нижается п
ваниях се
компенсац
рвоте, при
15 Практикум

парциальном давлении кислорода, кровь выделяет углекислоту и насыщается кислородом.

Щелочным резервом (или «резервной щелочностью») плазмы крови называют количество углекислого газа в миллилитрах при давлении 760 мм и температуре 0° , которое может связать 100 мл кровяной плазмы [в атмосфере, содержащей 5,5% CO_2 (что соответствует парциальному давлению углекислого газа в артериальной крови или альвеолярном воздухе)]. Углекислота связывается щелочами крови в виде бикарбоната и лишь небольшая часть CO_2 остается физически растворенной в плазме. В норме плазма крови содержит 52—65 объемных процентов CO_2 , т. е. от 52 до 65 мл углекислого газа на 100 мл плазмы. Уменьшение щелочного резерва является признаком ацидоза, т. е. преобладания в организме кислот, которые и выделяются при этом с мочой в виде аммонийных солей. Повышенный щелочной резерв указывает на алкалоз — состояние, обратное ацидозу — преобладание в организме щелочей, которые при этом выделяются с мочой в виде щелочных солей органических кислот.

Щелочной резерв крови понижается при нефритах, заболеваниях сердца в стадии декомпенсации, диабете. Алкалоз наблюдается при сильной рвоте, при усиленном дыхании (гипервентиляции) и при

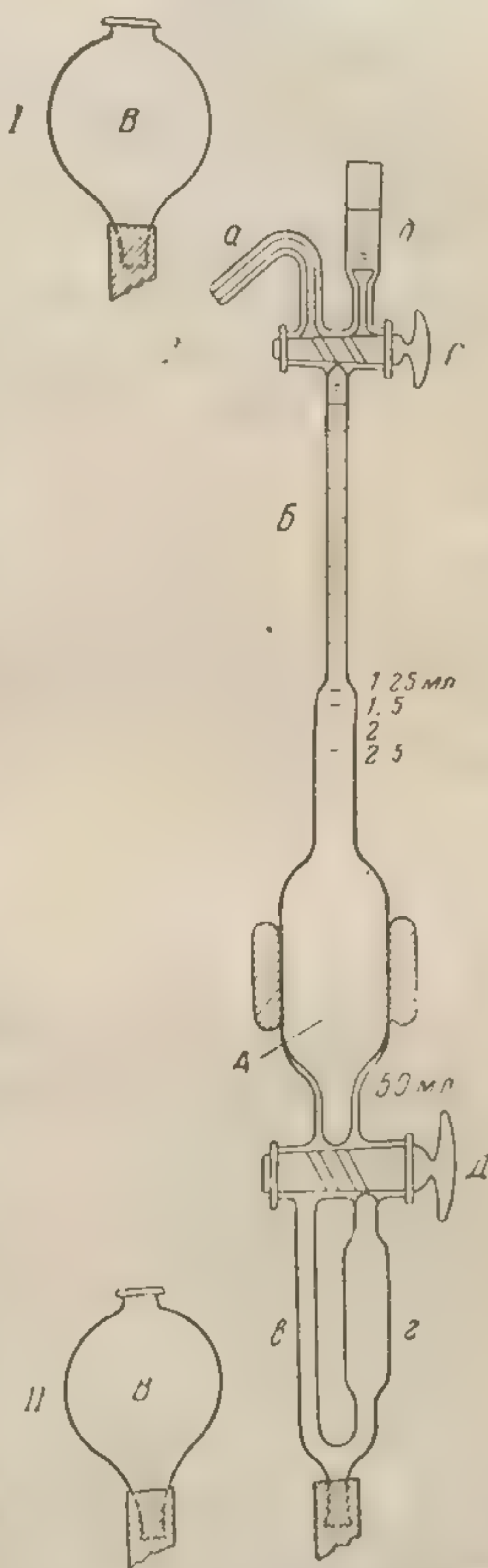


Рис. 28. Аппарат ван Слайка для определения углекислого газа.

некоторых других состояниях. Следует отметить, что нарушения кислотно-щелочного равновесия (ацидоз и алкалоз) в значительной мере зависят от пищевого режима (см. стр. 272).

Прибор для определения щелочного резерва (аппарат ван Слайка, рис. 28) состоит из специальной газометрической бюретки *Б* с расширением (смесителем) *А*. По обоим концам бюретки *АБ* находятся двухходовые краны *Г* и *Д*. Верхний кран *Г* может соединяться с бюреткой *б* и отростком для слива *а*. Нижний кран *Д* соединяет расширение газометрической бюретки *А* с сообщающимися трубками *в* и *г*,

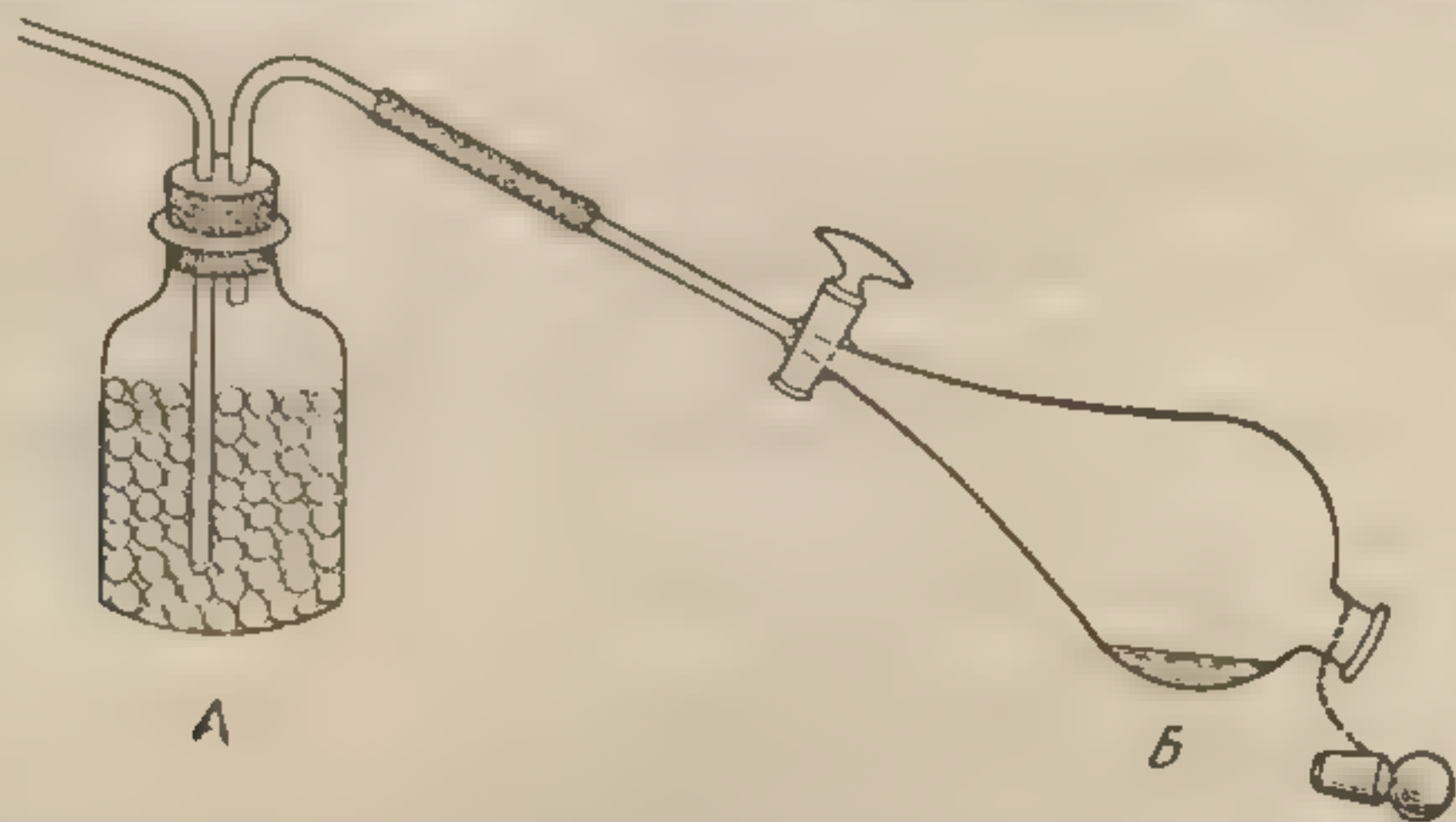


Рис. 29. Приспособление для насыщения плазмы альвеолярным воздухом.

А — банка со стеклянными бусами; *Б* — делительная воронка.

которые соединены при помощи каучуковой трубки с грушей *В*. Нижняя часть прибора, груша и соединяющая их трубка заполнены чистой ртутью. Краны должны быть хорошо промазаны и не должны пропускать воздуха.

Для производства определения свежую кровь предохраняют от свертывания добавлением щавелевокислого калия, отделяют плазму центрифугированием и насыщают ее альвеолярным воздухом в специальном приспособлении (рис. 29). При этом плазма связывает столько углекислого газа, сколько она обычно содержит в артериальной крови. Определенное количество такой насыщенной плазмы вводят в аппарат ван Слайка (рис. 28), выделяют из нее углекислый газ при помощи кислоты и измеряют объем газа в газометрической бюретке *Б* при атмосферном давлении.

П р и б о р ы. 1. Аппарат ван Слайка для определения углекислого газа (рис. 28).

2. Приспособление для насыщения плазмы углекислотой (рис. 29).

3. Шприц с иглой (для взятия крови).
4. Пипетка на 2—3 мл.
5. Пипетка на 1 мл с нижней меткой выше конца пипетки (для отмеривания плазмы).
6. Центрифуга.
7. Центрифужные пробирки, 2 шт.
8. Центрифужные весы (рис. 30).

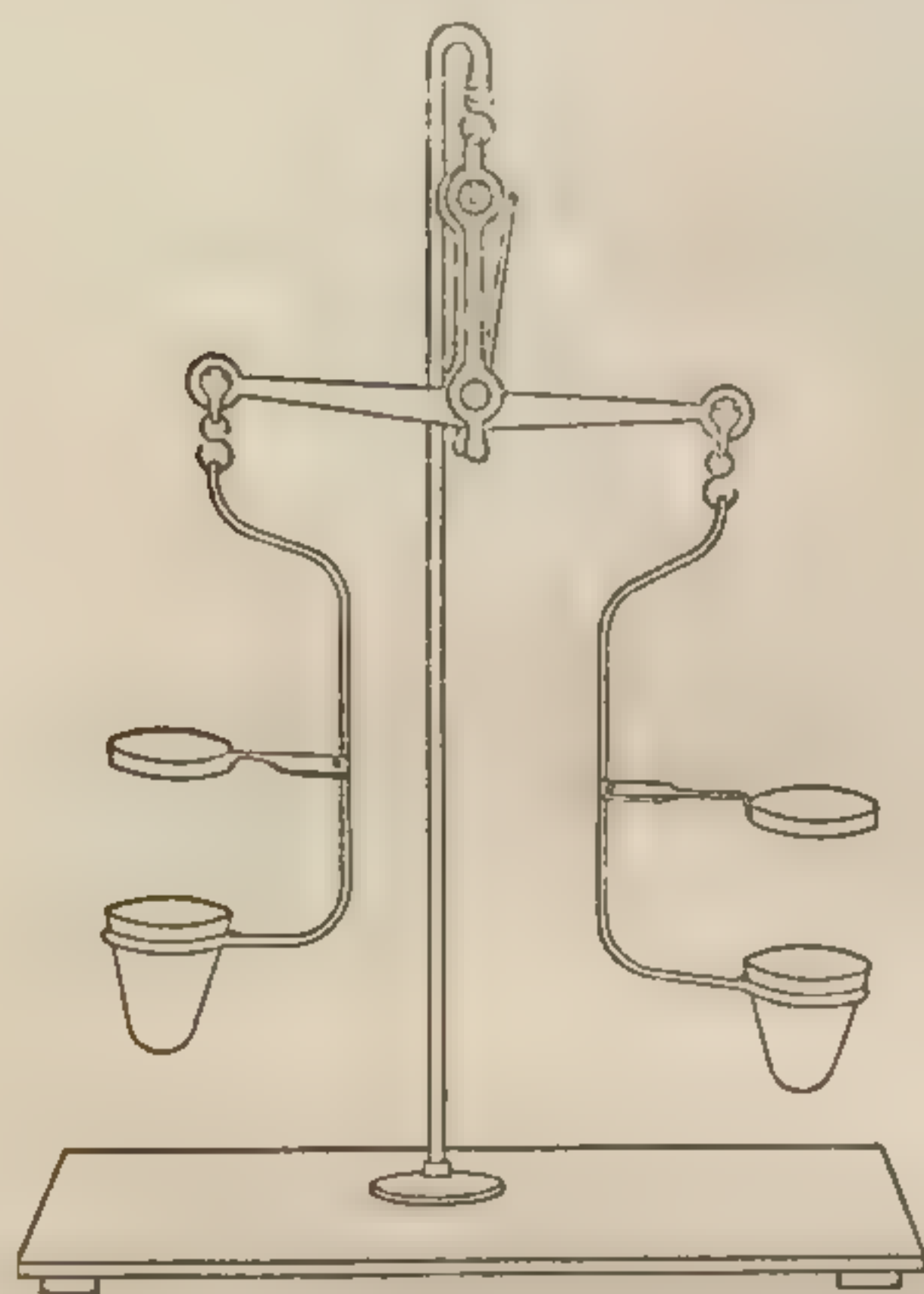


Рис. 30. Центрифужные весы.

9. Барометр.
10. Термометр.
11. Коническая колба или стакан для слива.

- Р е а к т и в ы.
1. Этиловый спирт.
 2. Иодная настойка.
 3. Щавелевокислый калий, мелко истолченный.
 4. Серная кислота, 10% раствор.
 5. Аммиак, 1% раствор, не содержащий CO_2 (приготовление см. стр. 321, п. 3).
 6. Каприловый (октиловый) спирт.

Ход работы¹

1. На дно центрифужной пробирки помещают 25—30 мг мелко истолченного щавелевокислого калия.

2. Берут при помощи шприца из вены животного 8—10 мл крови, стараясь не пользоваться жгутом, сливают кровь в центрифужную пробирку с оксалатом и осторожно перемешивают.

3. Уравновешивают пробирку с кровью (вместе с гильзой) пробиркой с водой (с гильзой) и центрифугируют в течение 5—10 минут.

4. Из пробирки берут сухой пипеткой 3—4 мл плазмы и переносят их в делительную воронку *Б*, приспособления для насыщения плазмы альвеолярным воздухом (рис. 29).

5. Открывают кран делительной воронки и, сделав неглубокий вдох, быстро и по возможности полностью выдыхают воздух через банку *А* в делительную воронку *Б*. Перед концом выдоха делительную воронку *Б* плотно закрывают пробкой и закрывают кран воронки.

Выдыхаемые водяные пары при этом оседают на бусах в банке *А*, а делительная воронка *Б* заполняется альвеолярным воздухом.

6. Делительную воронку *Б* отделяют от банки *А* и медленно вращают в руках в течение 3—4 минут, распределяя плазму тонким слоем по внутренней поверхности воронки для полного насыщения углекислотой альвеолярного воздуха.

7. Делительную воронку ставят в кольцо штатива в вертикальном положении для того, чтобы плазма могла полностью стечь на ее дно.

8. В бюретку *б* прибора для определения углекислоты (рис. 28) наливают 2—3 мл раствора аммиака и, открыв кран *Г* (на соединение с *б*) и кран *Д*, промывают прибор раствором аммиака, впуская его в бюретку *АБ* и несколько раз поднимая и опуская грушу с ртутью *В*.

9. Повернув кран *Г* на соединение с отростком *а*, постепенно поднимают грушу *В* и заполняют ртутью весь при-

¹ Для первоначального ознакомления с методом определения щелочного резерва рекомендуется пользоваться готовой оксалатной плазмой животного, например, кролика. В этом случае определение ведут с п. 4.

бор, включая каналец крана Г. Раствор аммиака при этом удаляют через отросток а.

10. Поворачивают кран Г на соединение с бюреткой б и, продолжая высоко держать грушу В, заполняют ртутью второй каналец крана Г и вводят немного ртути в бюретку б, после чего кран Г закрывают.

11. В бюретку б над ртутью наливают 0,4—0,5 мл раствора аммиака.

12. Проверяют прибор на отсутствие воздуха и жидкости над ртутью. Для этого при закрытом кране Г и открытом кране Д опускают грушу В вниз, создавая в приборе вакуум. Затем медленно поднимают грушу В. Ртуть при этом должна быстро подниматься в бюретке Б и, ударяясь о кран Г, издавать характерный металлический звук.

Не следует поднимать грушу с ртутью слишком быстро, так как силы удара ртути может быть достаточно, чтобы разбить прибор.

Если металлического звука не получается, то грушу закрепляют в нижнем положении, проминают каучуковую трубку и несколько раз поднимают и опускают грушу, стараясь собрать над ртутью пузырьки воздуха и капельки жидкости, которые могли остаться в приборе. Жидкость или воздух над ртутью удаляют через отросток а, после чего снова проверяют прибор, пока не получают металлического звука, указывающего на полное заполнение прибора ртутью.

13. Открывают пробку делительной воронки, быстро набирают плазму в сухую пипетку на 1 мл (между двумя метками) и вводят точно 1 мл плазмы в бюретку б под слой аммиака.

14. Закрепляют грушу В в положении II, открывают кран Д и осторожно, соединяя кран Г с бюреткой б, впускают в газометрическую бюретку Б всю плазму и часть аммиака.

15. В бюретку б наливают 0,5—0,6 мл воды, добавляют каплю каприлового спирта (для предотвращения вспенивания) и снова вводят краном Г в прибор раствор аммиака и большую часть воды, смывая таким образом остатки плазмы. В бюретке б над краном должно остаться 1—2 капли воды и ни одного пузырька воздуха не должно попадать в каналец крана Г.

16. В бюретку б наливают около 2 мл раствора серной кислоты и вводят их в прибор при помощи крана Г до тех

пор, пока уровень ртути не дойдет до метки «2,5 мл» в бюретке *АБ*, после чего кран *Г* закрывают.

17. Грушу *В* опускают до такого положения, когда уровень ртути в приборе достигнет метки «50 мл», и закрывают нижний кран *Д*.

В образовавшемся вакууме выделяется углекислый газ, вытесняемый из плазмы серной кислотой.

18. Для перемешивания плазмы с кислотой и более полного выделения углекислого газа прибор вынимают из штатива, несколько (5—8) раз о с т о р о ж н о переворачивают и снова ставят в штатив.

19. Опускают грушу *В* приблизительно на 1 м ниже положения *II* и, поворачивая кран *Д* на соединение с трубкой *г*, втягивают в нее всю жидкость из резервуара *А*, оставляя каналец крана *Д* заполненным жидкостью, и закрывают кран.

20. Поднимая грушу *В*, переводят кран *Д* на соединение с трубкой *в*. Продолжают поднимать грушу, пока ртуть в газометрической бюретке *Б* и груше *В* не установится на одном уровне, и измеряют объем газа по делениям бюретки *Б*. Кран *Д* закрывают.

Благодаря тому, что объем углекислого газа измеряется в бюретке *Б*, а жидкость, содержащая плазму, находится в трубке *г*, углекислота не может обратно поглощаться плазмой при атмосферном давлении.

21. Записывают температуру и барометрическое давление.

22. Для очистки прибора опускают грушу *В*; при помощи крана *Д* соединяют *А* с *в*, поворачивают кран *Д* на соединение *г* с *А* и кран *Г* — на соединение с отростком *а* и, поднимая грушу, удаляют через отросток *а* газ и жидкость над ртутью в коническую колбу для слива.

Кран *Г* закрывают, наливают в бюретку *б* 3—4 мл раствора аммиака и промывают им прибор (см. пп. 8 и 9).

23. Найденный объем газа приводят к объему при 760 мм давления по формуле:

$$v_0 = \frac{v \cdot P}{760},$$

где v_0 — приведенный объем газа; v — найденный объем газа; P — барометрическое давление.

Зная приведенный объем газа и температуру опыта, находят по табл. 6 количество миллилитров углекислого

Таблица 6

$\frac{P}{v_{760}}$	100 мл плазмы связывают CO_2 (в мл) в виде бикарбоната при 0° и 760 мм			
	15°	20°	25°	30°

Таблица 6

$v \frac{P}{760}$	100 мл плазмы связывают CO ₂ (в мл) в виде бикарбоната при 0° и 760 мм				$v \frac{P}{760}$	100 мл плазмы связывают CO ₂ (в мл) в виде бикарбоната при 0° и 760 мм			
	15°	20°	25°	30°		15°	20°	25°	30°
0,20	9,1	9,9	10,7	11,8	0,60	47,7	48,1	48,5	48,6
0,21	10,1	10,9	11,7	12,6	0,61	48,7	49,0	49,4	49,5
0,22	11,0	11,8	12,6	13,5	0,62	49,7	50,0	50,4	50,4
0,23	12,0	12,8	13,6	14,3	0,63	50,7	51,0	51,3	51,4
0,24	13,0	13,7	14,5	15,2	0,64	51,6	51,9	52,2	52,3
0,25	13,9	14,7	15,5	16,1	0,65	52,6	52,8	53,2	53,2
0,26	14,9	15,7	16,4	17,0	0,66	53,6	53,8	54,1	54,1
0,27	15,9	16,6	17,4	18,0	0,67	54,5	54,8	55,1	55,1
0,28	16,8	17,6	18,3	18,9	0,68	55,5	55,7	56,0	56,0
0,29	17,8	18,5	19,2	19,8	0,69	56,5	56,7	57,0	56,9
0,30	18,8	19,5	20,2	20,8	0,70	57,4	57,6	57,9	57,9
0,31	19,7	20,4	21,1	21,7	0,71	58,4	58,6	58,9	58,8
0,32	20,7	21,4	22,1	22,6	0,72	59,4	59,5	59,8	59,7
0,33	21,7	22,3	23,0	23,5	0,73	60,3	60,5	60,7	60,6
0,34	22,6	23,3	24,0	24,5	0,74	61,3	61,4	61,7	61,6
0,35	23,6	24,2	24,9	25,4	0,75	62,3	62,4	62,6	62,5
0,36	24,6	25,2	25,8	26,3	0,76	63,2	63,3	63,6	63,4
0,37	25,5	26,2	26,8	27,3	0,77	64,2	64,3	64,5	64,3
0,38	26,5	27,1	27,7	28,2	0,78	65,2	65,3	65,5	65,3
0,39	27,5	28,1	28,7	29,1	0,79	66,1	66,2	66,4	66,2
0,40	28,4	29,0	29,6	30,0	0,80	67,1	67,2	67,3	67,1

231

Таблица 6 (продолжение)

$v \frac{P}{760}$	100 мл плазмы связывают CO ₂ (в мл) в виде бикарбоната при 0° и 760 мм				$v \frac{P}{760}$	100 мл плазмы связывают CO ₂ (в мл) в виде бикарбоната при 0° и 760 мм			
	15°	20°	25°	30°		15°	20°	25°	30°
0,41	29,4	30,0	30,5	31,0	0,81	68,1	68,1	68,3	68,0
0,42	30,3	30,9	31,5	31,9	0,82	69,0	69,1	69,2	69,0
0,43	31,3	31,9	32,4	32,8	0,83	70,0	70,0	70,2	69,9
0,44	32,3	32,8	33,4	33,8	0,84	71,0	71,0	71,1	70,8
0,45	33,2	33,8	34,3	34,7	0,85	71,9	72,0	72,1	71,8
0,46	34,2	34,7	35,3	35,6	0,86	72,9	72,9	73,0	72,7
0,47	35,2	35,7	36,2	36,5	0,87	73,9	73,9	74,0	73,6
0,48	36,1	36,6	37,2	37,4	0,88	74,8	74,8	74,9	74,5
0,49	37,1	37,6	38,1	38,4	0,89	75,8	75,8	75,8	75,4
0,50	38,1	38,5	39,0	39,3	0,90	76,8	76,7	76,8	76,4
0,51	39,1	39,5	40,0	40,3	0,91	77,8	77,7	77,7	77,3
0,52	40,0	40,4	40,9	41,2	0,92	78,7	78,8	78,7	78,2
0,53	41,0	41,4	41,9	42,1	0,93	79,7	79,6	79,6	79,2
0,54	42,0	42,4	42,8	43,0	0,94	80,7	80,5	80,6	80,1
0,55	42,9	43,3	43,8	43,9	0,95	81,6	81,5	81,5	81,0
0,56	43,9	44,3	44,7	44,9	0,96	82,6	82,5	82,4	82,0
0,57	44,9	45,3	45,7	45,8	0,97	83,6	83,4	83,4	82,9
0,58	45,8	46,2	46,6	46,7	0,98	84,5	84,4	84,3	83,8
0,59	46,8	47,1	47,5	47,6	0,99	85,5	85,3	85,2	84,8
0,60	47,7	48,1	48,5	48,6	1,00	86,5	86,2	86,2	85,7

газа (при
100 мм.г.
по.т.
на физ.
процент

Пит
гемол
протеид
ческой
Гем
соедине
и соде
При
(гем) о
мин,

Хар
призна

газа (при температуре 0° и давлении 760 мм), связанных 100 мл плазмы в виде бикарбоната.

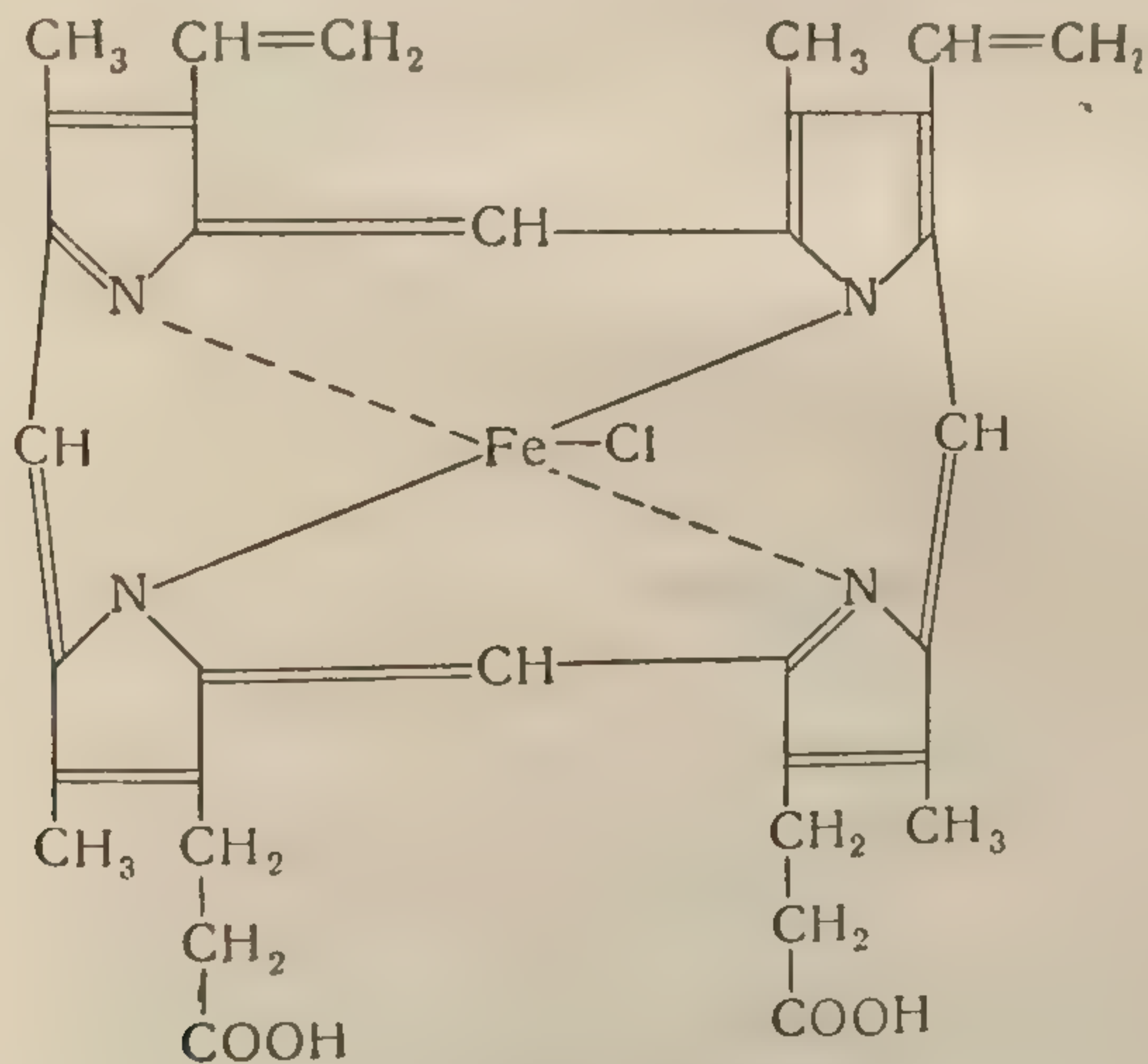
Полученная величина, умноженная на 1,017 (поправка на физически растворенную уголекислоту), дает объемный процент CO_2 в плазме крови.

ПОЛУЧЕНИЕ КРИСТАЛЛОВ ГЕМИНА

Пигмент красных кровяных шариков носит название гемоглобина и является сложным белком (хромопротеидом). Он состоит из белка глобина и протетической группы — гема.

Гем в свою очередь является сложным органическим соединением, состоящим из четырех пиррольных колец и содержащим двухвалентное железо.

При действии на гемоглобин кислот небелковая группа (гем) отщепляется и в присутствии солей переходит в гемин, в котором железо трехвалентное.



Солянокислый гемин

Характерный вид кристаллов гемина (рис. 31) служит признаком присутствия гемоглобина.

П р и б о р ы. 1. Микроскоп.

2. Предметные стекла.

3. Покровные стекла.

Р е а к т и в ы. 1. Дефибринированная кровь.

2. Уксусная кислота, ледяная, содержащая галогеновые соли (приготовление см. стр. 329, п. 38)¹.



Рис. 31. Кристаллы гемина.

Х о д , р а б о т ы

1. Наносят на предметное стекло каплю крови, размазывая ее по стеклу.

2. Осторожно подсушивают кровь, держа стекло высоко над пламенем горелки (не перегревать!).

3. Прибавляют к подсушенной крови 1—2 капли уксусной кислоты, накрывают покровным стеклом и осторожно нагревают до закипания.

¹ Для получения кристаллов гемина из свежей крови можно пользоваться ледяной уксусной кислотой, так как свежая кровь содержит достаточно ионов хлора. Добавление галогеновых солей необходимо в случае судебно-медицинского исследования кровавых пятен, которые могут содержать недостаточно хлористых солей.

4. Вводят пипеткой под покровное стекло еще 1—2 капли уксусной кислоты и рассматривают выделившиеся кристаллы гема под микроскопом при большом увеличении (не менее 500 раз) (рис. 31).

ГВАЯКОВАЯ ПРОБА НА КРОВЬ

Гваяковая проба основана на окислении гваяковой смоляной кислоты в ее озонид перекисью водорода с помощью кровяного пигмента. Кровяной пигмент катализирует окисление перекисью водорода, т. е. обладает пероксидазными свойствами.

В отличие от фермента пероксидазы кровяной пигмент сохраняет свои пероксидазные свойства при кипячении. Поэтому гваяковая проба удастся не только со свежей кровью, но и с прокипяченным раствором крови, со старыми сухими кровяными пятнами и т. д. Чувствительность пробы позволяет открыть наличие крови при разбавлении ее до 1 : 10 000.

Пробой пользуются при клинических и судебно-медицинских исследованиях.

Одной гваяковой пробы, однако, недостаточно для окончательного суждения о наличии крови, так как положительную реакцию дают все объекты, содержащие пероксидазу.

П р и б о р ы. Штатив с пробирками.

Р е а к т и в ы. 1. Дефибринированная кровь.

2. Гваяковая смола, свежеприготовленный спиртовый раствор (приготовление см. стр. 322, п. 10).

3. Перекись водорода, 3% раствор.

Х о д р а б о т ы

1. В пробирку помещают каплю дефибринированной крови, добавляют около 5 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивают.

2. Приливают к содержимому пробирки около 1 мл спиртового раствора гваяковой смолы и каплю перекиси водорода.

3. Наблюдают появление синего окрашивания, что указывает на образование озонида гваяковой смоляной кислоты.

БЕНЗИДИНОВАЯ ПРОБА НА КРОВЬ

Бензидиновая проба основана на окислении бензидина:



за счет кислорода перекиси водорода с помощью кровяного пигмента. Получающиеся продукты окисления бензидина имеют синюю или зеленую окраску, что служит указанием на присутствие крови.

Бензидиновая проба очень чувствительна и удаётся при разбавлении крови до 1 : 200 000, однако она, так же как и гваяковая проба (см. выше), недостаточно специфична.

П р и б о р ы. Штатив с пробирками.

Р е а к т и в ы: 1. Дефибринированная кровь.

2. Бензидин, 5% раствор в ледяной уксусной кислоте, свежеприготовленный.

3. Перекись водорода, 3% раствор.

Х о д р а б о т ы

1. В пробирку помещают около 1 мл сильно разведенной крови.

2. Добавляют равный объем раствора бензидина и несколько капель раствора перекиси водорода.

3. Наблюдают появление синего или зеленого окрашивания.

СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПИГМЕНТОВ КРОВИ

В крови, наряду с гемоглобином (Hb), встречается также ряд пигментов, производных гемоглобина.

О к с и г е м о г л о б и н (HbO_2) является непрочным соединением гемоглобина с кислородом. В этом виде в крови нормально содержится большая часть пигмента.

К а р б о к с и г е м о г л о б и н (HbCO) — довольно прочное соединение гемоглобина с окисью углерода, образуется в крови при вдыхании окиси углерода (угарный газ, светильный газ и т. п.). Накопление карбоксигемоглобина в крови нарушает дыхательную функцию крови и ведет к отравлению.

М е т г е м о г л о б и н (MНb) содержит трехвалентное железо и появляется в крови при отравлении некоторыми веществами (например, красной кровяной солью).

В некоторых случаях в крови могут появляться и безбелковые производные гемоглобина.

В клинике и в судебно-медицинской практике важно обнаружение тех или иных пигментов крови. Для этой цели пользуются спектральным анализом. Исследование пигментов крови при помощи спектрального анализа оказывает существенную помощь в диагностике ряда заболеваний и отравлений, в определении профессиональных вредностей и в судебно-медицинских вопросах.

Приводим принципы спектрального анализа.

При разложении белого света с помощью призмы или специального прибора — спектроскопа — получается спектр, где цветные полосы, соответствующие излучению различной длины волны, располагаются в порядке убывающей длины волны, давая последовательность цветов радуги. Если видимый свет проходит через слой окрашенного вещества, то последнее избирательно поглощает лучи определенной длины волны и проходящий свет дает характерный спектр поглощения.

При исследовании такого спектра замечают, что определенные полосы спектра поглощения представляются в виде темных полос, соответствующих лучам, которые поглотил исследуемый пигмент. Так как определенному пигменту соответствует и определенный спектр поглощения, последний может служить для целей анализа на присутствие того или иного пигмента.

Для точного определения положения в спектре полос поглощения различных пигментов используют то обстоятельство, что солнечный спектр не является непрерывным, а имеет ряд тонких черных линий, так называемых фрауэнгоферовых линий. Фрауэнгоферовы линии — это узкие полосы поглощения тех веществ, которые содержатся в атмосфере солнца в виде паров и поглощают определенные лучи света, испускаемого раскаленной солнечной массой.

На основании измерения длин волн, соответствующих фрауэнгоферовым линиям, была построена шкала, дающая возможность точно определить положение в спектре полос поглощения различных веществ.

Для спектрального анализа применяются специальные приборы — спектроскопы — разнообразной, нередко сложной конструкции.

Спектроскопическому исследованию кровяных пигментов в клинических целях удовлетворяет ручной спектро-скоп сравнительно простой конструкции (рис. 32).

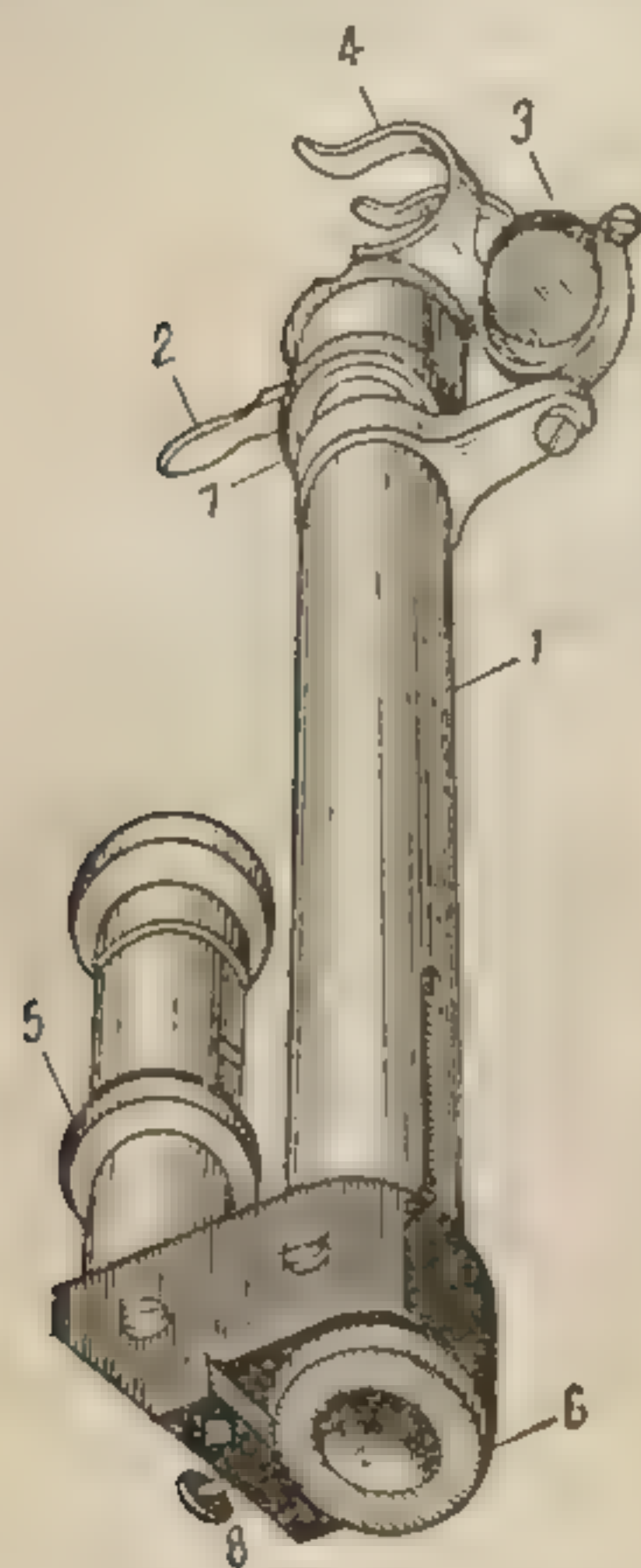


Рис. 32. Ручной спектро-скоп.

1 — трубка с призмой; 2 — заслонка для разделения спектра на две части (вверху — солнечный, внизу — исследуемой жидкости); 3 — зеркало; 4 — зажим для пробирки; 5 — винт для фокусировки шкалы; 6 — окуляр; 7 — установка для ширины щели; 8 — винт для установки шкалы.

(рис. 33, 2). Эти полосы поглощения исчезают при разведении около 1 : 15 000.

Приборы. 1. Спектроскоп.

2. Штатив с пробирками.

3. Пипетки.

4. Мерные цилиндры.

Реактивы. 1. Дефибринированная кровь.

2. Реактив Стокса (приготовление см. стр. 331, п. 51).

3. Железосинеродистый калий, насыщенный раствор свежеприготовленный.

Ход работы

I. Оксигемоглобин (HbO_2)

Дефибринированную кровь разводят пятью объемами воды и наблюдают в спектро-скоп. Затем постепенно разбавляют кровь и вновь наблюдают в спектро-скоп. По мере разведения крови в растворах оксигемоглобина, начиная с 0,1%, при толщине слоя в 1 см становятся видны две полосы поглощения между фрауэнгоферовыми линиями D и E

II. Гемоглобин (Hb)

Для получения так называемого восстановленного гемоглобина к раствору оксигемоглобина приливают несколько капель реактива Стокса. Двухвалентное железо, являющееся действующим началом реактива Стокса, легко окисляется, отнимая от оксигемоглобина кислород и превращая его в «восстановленный» гемоглобин. Следует отметить, что вообще соли железа легче окисляются, чем железо порфи-

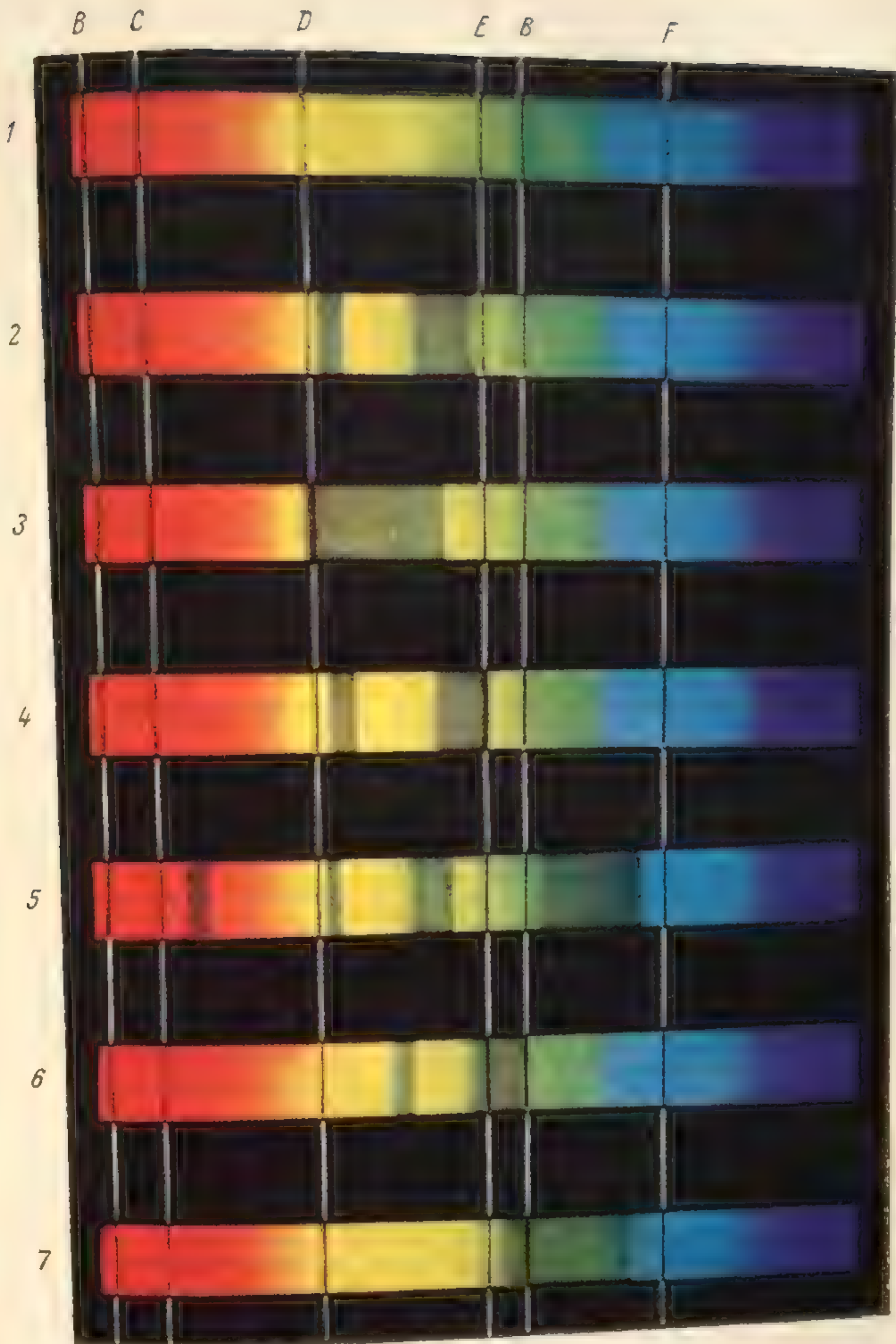


Рис. 33. Спектры поглощения.

1 — солнечный спектр; 2 — оксигемоглобин; 3 — гемоглобин; 4 — карбоксигемоглобин; 5 — метгемоглобин (нейтральный); 6 — гемохромоген (щелочной); 7 — уробилин (в щелочном растворе в присутствии хлористого цинка).

...его жидк
кости, окисл
...Восстановите
кую пол

Для получ
ную кресь на
зом, котсры
растворы кар
лосы пог
поглоще
нутые к
(рис. 33; 4).

Для пол
кровь развод
ко капель ра
тывают. Пол
окраску, и
глоще ни
и две — меж
можно видети
спектра (рис

Карбокси
соедине
ствие карбо
нению алог
чи. Нормаль
ся в бурый
вания, соотв
анион кисло
Прибо

Реакт

ринового комплекса, а железо, связанное в порфириновом кольце, окисляется легче, чем железо в циановом комплексе. „Восстановленный“ гемоглобин дает только одну широкую полосу поглощения (рис. 33; 3).

III. Карбоксигемоглобин (HbCO)

Для получения карбоксигемоглобина дефибрированную кровь насыщают окисью углерода или светильным газом, который содержит окись углерода. Разбавленные растворы карбоксигемоглобина дают в спектре две полосы поглощения, сходные с полосами поглощения оксигемоглобина, но сдвинутые к фиолетовой части спектра (рис. 33; 4).

IV. Метгемоглобин (MnHb)

Для получения метгемоглобина дефибрированную кровь разводят пятью объемами воды, добавляют несколько капель раствора железосинеродистого калия и взбалтывают. Полученная жидкость приобретает красную окраску, и в спектре появляются три полосы поглощения: одна — резкая в красной части спектра и две — между линиями *D* и *E*. В хорошем спектроскопе можно видеть и четвертую полосу в синевато-зеленой части спектра (рис. 33; 5).

ПРОБА НА КАРБОКСИГЕМОГЛОБИН

Карбоксигемоглобин — значительно более прочное соединение, чем оксигемоглобин. Присутствие карбоксигемоглобина можно обнаружить по сохранению алого цвета крови после прибавления щелочи. Нормальная кровь при добавлении щелочи окрашивается в бурый цвет вследствие образования гематина (основания, соответствующего гемину, т. е. гемина, у которого анион кислоты, например, хлора, заменен на гидроксил).

П р и б о р ы. 1. Фарфоровая пластинка или кусок стекла.

2. Пипетка.

Р е а к т и в ы 1. Едкий натр, 10% раствор.

2. Дефибрированная кровь.

3. Дефибрированная кровь, насыщенная окисью углерода (светильным газом).

Ход работы

1. Наносят на фарфор или стекло каплю крови, насыщенной окисью углерода.

2. Добавляют каплю раствора щелочи. Наблюдают алую окраску крови.

3. Повторяют ту же пробу с нормальной дефибринированной кровью. Отмечают бурую окраску вследствие разложения оксигемоглобина и образования гематина.

ИССЛЕДОВАНИЕ КРОВЯНЫХ ПЯТЕН

Обнаружение пятен крови на одежде или различных предметах имеет большое значение в судебной медицине.

Наличие крови может быть установлено рядом реакций. Наиболее употребительны при исследовании кровяных пятен проба на кристаллы гемина, гваяковая и бензидиновая пробы, а также спектроскопическое исследование. При спектроскопическом исследовании наиболее чувствительной является проба на **гемохромоген**. Гемохромоген получают расщеплением кровяного пигмента щелочью или восстановлением его в щелочной среде. Гемохромоген содержит двухвалентное железо и представляет собой восстановленный гематин (т. е. гем), соединенный с денатурированным глобином.

Указанные методы не дают возможности установить, принадлежит ли кровь человеку или какому-либо животному. Для этой цели пользуются иммунологическими реакциями, которые позволяют определить видовую принадлежность крови.

П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.

2. Скальпель.

3. Спектроскоп.

4. Микроскоп.

5. Пипетка.

Р е а к т и в ы. 1. Тряпочка, пропитанная кровью и высушенная.

2. Едкий натр, 10% раствор.

3. Реактив Стокса (приготовление см. стр. 331, п. 51).

4. Уксусная кислота, ледяная, содержащая галогеновые соли (приготовление см. стр. 329, п. 38).

1. Делаю
кровью, на
мина, котор
2. Небол
лями дест
части.

3. С од
пробу (стр.

4. С дру
пробу (стр.

5. Треть
едкого натр
реактива Ст
характерны

* ОПР

Определе
очень больш
нии малокр
ниях.

Количест
лено различ
ываемого
в нем желе
мента. Пос
наиболее р

Для оп
пользуются
(рис. 34).

Гемометр
наполненны
циально под

16 Практикум

5. Гваяковая смола, спиртовой раствор, свежеприготовленный (приготовление см. стр. 322, п. 10).
6. Бензидин, 5% раствор в ледяной уксусной кислоте, свежеприготовленный.
7. Перекись водорода, 3% раствор.

Ход работы

1. Делают скальпелем соскоб с тряпочки, пропитанной кровью, на предметное стекло и получают кристаллы гемина, которые рассматривают под микроскопом (стр. 233).
2. Небольшую часть тряпочки экстрагируют 6—7 каплями дистиллированной воды и делят экстракт на три части.
3. С одной частью экстракта проделывают гваяковую пробу (стр. 235).
4. С другой частью экстракта производят бензидиновую пробу (стр. 236).
5. Третью часть экстракта подщелачивают 1—2 каплями едкого натра и кипятят. Охлаждают, добавляют 1—2 капли реактива Стокса и исследуют в спектроскопе. Получают характерный спектр гемохромогена (рис. 33; 6).

* ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ГЕМОГЛОБИНА

Определение количества гемоглобина в крови имеет очень большое диагностическое значение при распознавании малокровия и как симптом при различных заболеваниях.

Количество гемоглобина в крови может быть определено различными способами: например, по количеству связываемого им кислорода, по количеству содержащегося в нем железа, по интенсивности окраски кровяного пигмента. Последний способ (колориметрический) является наиболее распространенным.

Для определения гемоглобина этим способом обычно пользуются простейшим колориметром — гемометром (рис. 34).

Гемометр состоит из двух запаянных боковых пробирок, наполненных раствором солянокислого гемина или специально подобранной краски и служащих стандартом при

определении гемоглобина, и одной градуированной пробирки для исследуемой крови¹. Перед исследованием в эту пробирку наливают небольшое количество 0,1 н. соляной кислоты, а затем 20 μ л крови. Через 10—15 минут (за это время весь гемоглобин переходит в с о л я н о к и с л ы й г е м и н) начинают прибавлять в пробирку дистиллированную воду до тех пор, пока окраска крови не сравняется с окраской стандарта. Уровень жидкости в градуированной пробирке показывает содержание гемоглобина в исследуемой крови.

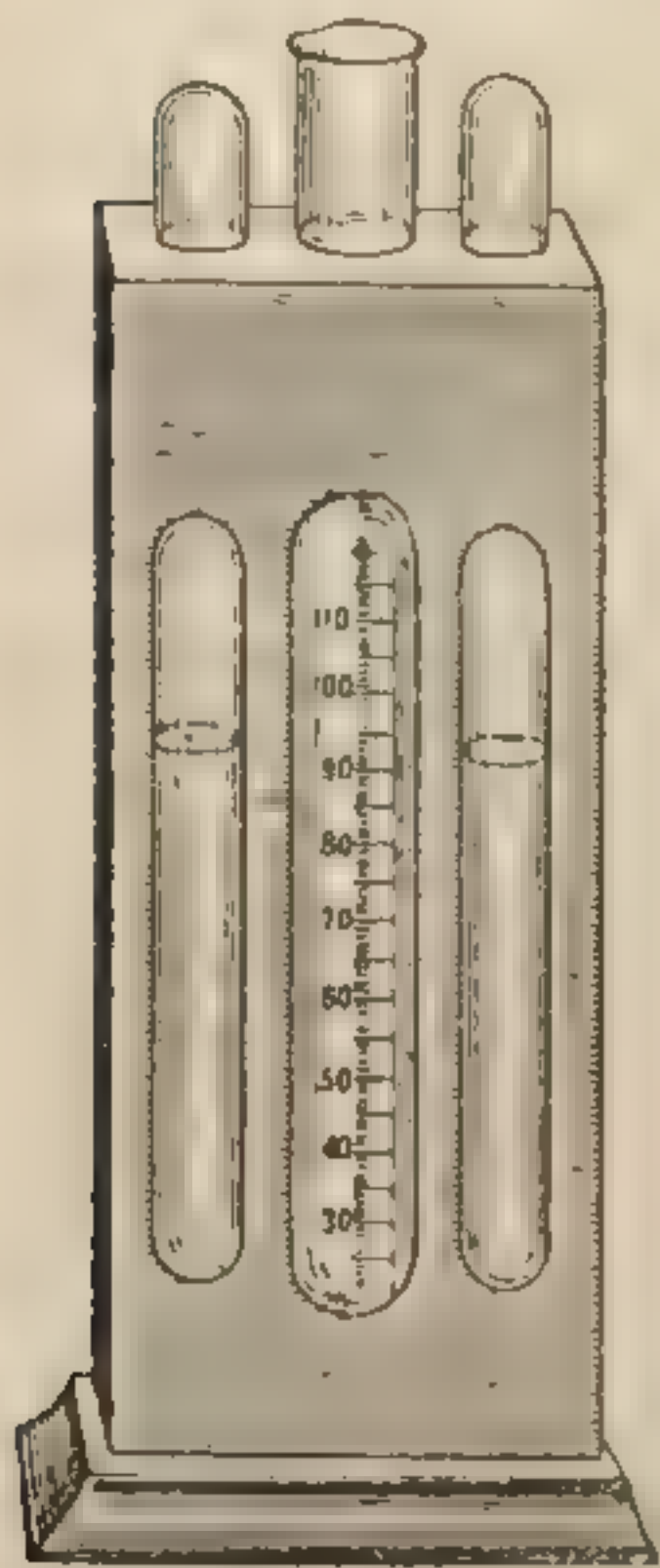


Рис. 34. Гемометр.

Цифра 100 на градуированной трубке гемометра соответствует 17,3 г гемоглобина в 100 мл крови и условно принимается за 100% гемоглобина в крови человека. Однако в действительности эта цифра несомненно несколько выше средней нормы².

Одним из источников ошибок при определении количества гемоглобина с помощью гемометра Сали является излишне поспешная работа. Следует помнить, что максимальная окраска раствора пигмента (см. ход работы) достигается не сразу, а постепенно; поэтому приливание дистиллированной воды производят через 10 или 15 минут (не ранее), и всегда точно соблюдая определенный промежуток времени, так как иначе могут получиться несравнимые результаты.

П р и б о р ы.

1. Гемометр.
2. Игла для взятия крови.
3. Специальная пипетка для взятия крови (на 20 μ л).
4. Тонкая стеклянная палочка.
5. Пипетка для дистиллированной воды.
6. Вата.
7. Марля.

¹ Вместо трубочек с краской в некоторых приборах употребляют невыцветающие цветные стеклянные палочки.

² Следует отметить, что имеющиеся в обращении гемометры нередко отличаются один от другого по интенсивности окраски стандарта. В последнее время в СССР выпускаются гемометры со стандартом, соответствующим 16 г гемоглобина в 100 мл крови.

- Р е а к т и в ы.**
1. Соляная кислота, 0,1 н. раствор.
 2. Этиловый спирт.
 3. Диэтиловый эфир.
 4. Иодная настойка.

Х о д : р а б о т ы

1. Наливают в градуированную пробирку гемометра раствор соляной кислоты до деления 10 на шкале.

2. Берут из пальца (см. стр. 78) специальной пипеткой точно 20 μ л крови и, обтерев кончик капилляра от приставшей снаружи крови, осторожно, не вызывая образования пены, выпускают кровь в кислоту, налитую в градуированную пробирку гемометра.

3. Промывают капилляр осторожным повторным втягиванием и выдуванием верхнего слоя кислоты и тщательно размешивают содержимое, осторожно ударяя пальцем по нижней части пробирки.

4. Через 10 минут прибавляют дистиллированную воду в градуированную пробирку, каждый раз хорошо перемешивая раствор тонкой стеклянной палочкой до тех пор, пока цвет жидкости в пробирке не сравняется с цветом стандарта.

Вначале сразу приливают относительно много дистиллированной воды (например, до деления 40). Когда цвет исследуемого раствора начнет приближаться к цвету стандарта, воду добавляют по 1—2 капли. Чем больше гемоглобина в исследуемой крови, тем больше воды приходится приливать к раствору. Деление на шкале показывает количество гемоглобина в процентах по отношению к условно принятой за 100% норме, но не истинный процент гемоглобина в крови.

В некоторых гемометрах рядом с обычной градуировкой наносят цифры, показывающие количество граммов гемоглобина в 100 мл крови, соответствующее данному делению шкалы пробирки.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Ряд неорганических катионов и анионов весьма важен для нормального обмена веществ¹.

Фосфорнокислый кальций, главным образом в виде двойных солей, сходных по составу с минералом апатитом:

¹ Минеральным обменом много занимался С. Я. Капланский, который является автором монографии по этому вопросу.

$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaX}_2$ (где X может быть анионом фтористоводородной, угольной, серной или некоторых других кислот), образует неорганическую основу костной ткани. Кальций играет также большую роль в процессах возбуждения и необходим для нормальной работы сердца, кишечного тракта и других органов.

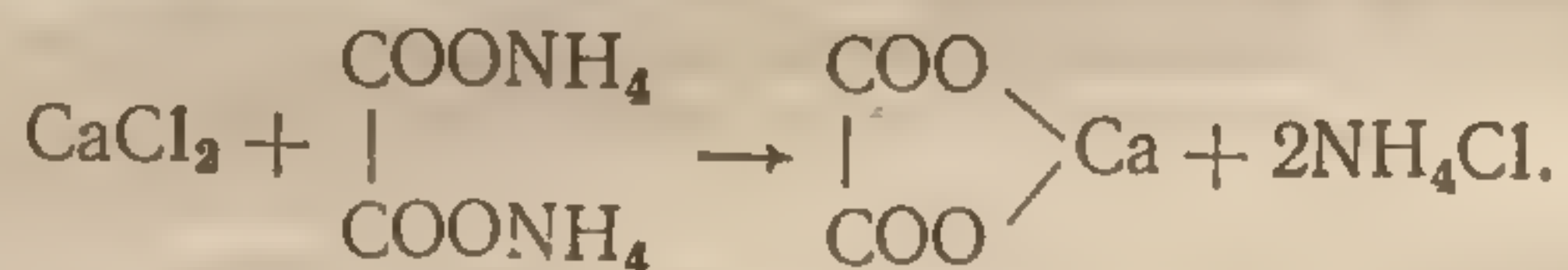
В ряде случаев важно поэтому знать, достаточна ли концентрация кальция в крови.

К а л ь ц и й крови содержится вне форменных элементов, и обычно его определяют в сыворотке, а не в цельной крови. В норме сыворотка содержит 9—11 мг% кальция.

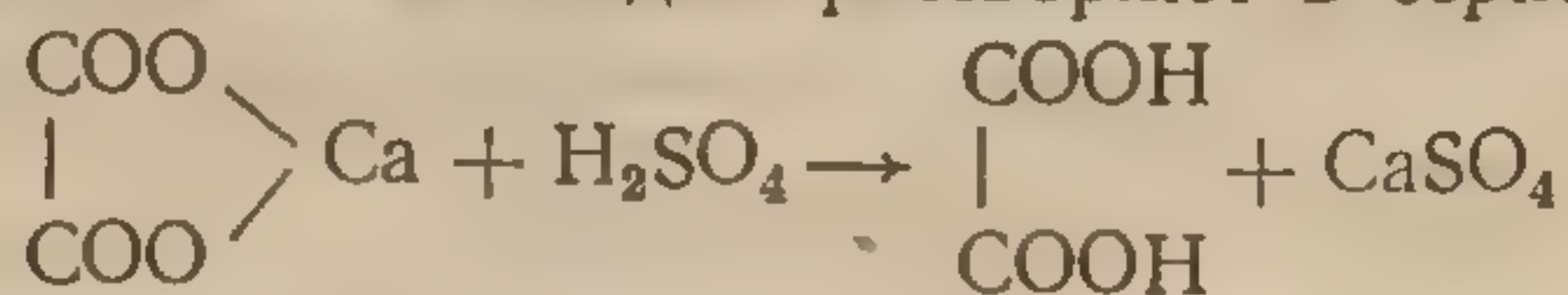
Количество кальция понижено при тетании у детей грудного возраста, иногда при рахите; превышает норму при деструктивных процессах в костной ткани и в некоторых других случаях.

В регуляции кальциевого обмена принимает участие гормон паращитовидных желез. Недостаточная функция этих желез ведет к снижению содержания кальция в крови и к развитию тетании. В и т а м и н D обуславливает правильное отложение кальция в костях. Недостаток этого витамина является одной из причин рахита.

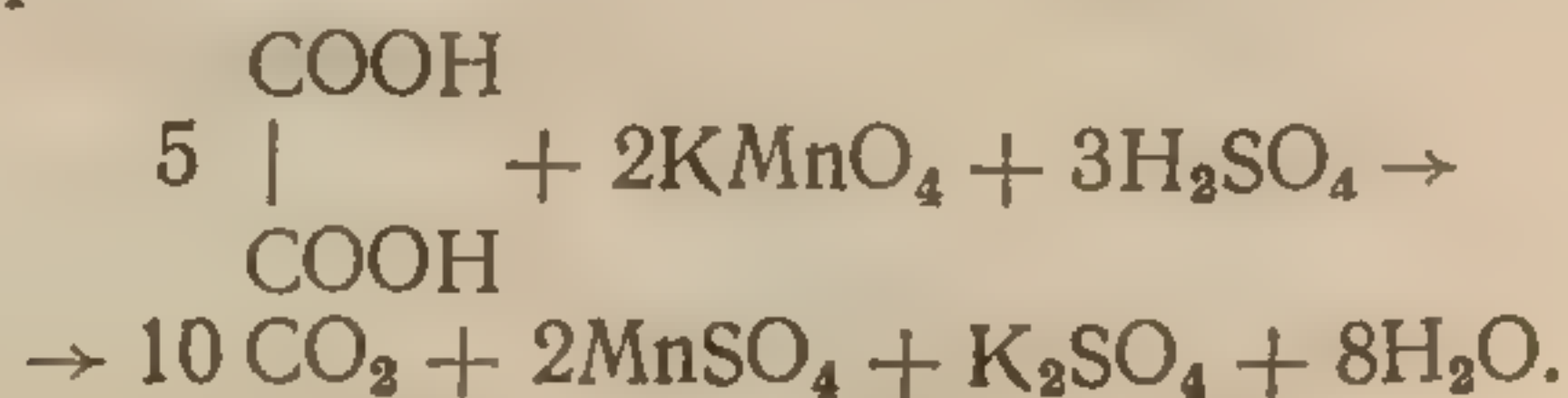
Определение кальция в сыворотке крови ведется путем осаждения кальция в виде соли щавелевой кислоты



Осадок щавелевокислого кальция легко растворим в минеральных кислотах, но практически нерастворим в слабо щелочной среде; его отмывают от избытка щавелевокислого аммония и других веществ плазмы разведенным раствором аммиака. Отмытый осадок растворяют в серной кислоте:



и щавелевую кислоту оттитровывают 0,01 н. раствором марганцовокислого калия в присутствии избытка серной кислоты:



Как видно
ганата, пошеди
лентно количе
Прибор

реактив

1. Отмерив
- а в другую
2. В перву
- воротки.
3. В обе пр
- вокислого ам
- ляют стоять
4. Центри
- чение 10 мин
5. Осторож
- жидкость из
- рают фильтро
- кости. Щавеле
- на дне в вид
6. Наливан
- твора аммиак
- в течение 10
7. Сливают
- осадок 2% ра
- описанные в

1 Пробирк
предварительно

Как видно из приведенных реакций, количество перманганата, пошедшее на окисление щавелевой кислоты, эквивалентно количеству кальция.

- П р и б о р ы.
1. Центрифуга.
 2. Центрифужные весы (рис. 30, стр. 227).
 3. Центрифужные пробирки с коротким и острым дном, 2 шт.
 4. Пипетки на 2 мл, 2 шт.
 5. Пипетка на 10 мл с делениями.
 6. Стеклянные палочки.
 7. Микробюретка.
 8. Водяная баня.

- Р е а к т и в ы.
1. Сыворотка крови.
 2. Щавелевокислый аммоний, 4% раствор.
 3. Аммиак, 2% раствор.
 4. Серная кислота, 1 н. раствор.
 5. Марганцовокислый калий, 0,01 н. раствор.

Х о д р а б о т ы

1. Отмеривают в одну центрифужную пробирку 2 мл, а в другую (контроль) — 4 мл дистиллированной воды.

2. В первую пробирку приливают пипеткой 2 мл сыворотки.

3. В обе пробирки приливают по 1 мл раствора щавелевокислого аммония, слегка встряхивают пробирки и оставляют стоять в течение 30 минут.

4. Центрифугируют содержимое обеих пробирок в течение 10 минут¹.

5. Осторожно, чтобы не взмутить осадок, сливают всю жидкость из пробирок, после чего края пробирок протирают фильтровальной бумагой для полного удаления жидкости. Щавелевокислый кальций в первой пробирке остается на дне в виде белого осадка.

6. Наливают в обе центрифужные пробирки по 4 мл раствора аммиака, встряхивают и вновь центрифугируют в течение 10 минут.

7. Сливают жидкость из пробирок и еще раз промывают осадок 2% раствором аммиака, повторяя манипуляции, описанные в п. 6.

¹ Пробирки и съемные центрифужные металлические гильзы предварительно должны быть попарно уравновешены.

8. Сливают после центрифугирования последние порции аммиака и в обе пробирки наливают по 2 мл раствора серной кислоты. Размешивают осадки стеклянными палочками и, не вынимая палочек, погружают пробирки на 2 минуты в горячую водяную баню.

9. Оттитровывают (помешивая палочками) горячий раствор из микробюретки 0,01 н. марганцовокислым калием до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение минуты.

10. Для вычисления количества миллиграммов кальция в 100 мл сыворотки крови из результата титрования опытной пробы вычитают результат титрования контрольного (слепого) опыта. Слепой опыт служит контролем на содержание в реактивах кальция (или других веществ, осаждающих щавелевую кислоту) и на полноту отмывания от избытка щавелевокислого аммония. Полученную разность умножают на титр марганцовокислого калия по кальцию, выраженный в миллиграммах, т. е. на количество миллиграммов кальция, соответствующее 1 мл титрованного раствора (для 0,01 н. KMnO_4 эта величина равна 0,2 мг), и на 50, так как определение производилось в 2 мл сыворотки, а вычисляется содержание в 100 мл.

Таким образом, если через x обозначить содержание кальция в сыворотке крови в миллиграмм-процентах, через a — результат титрования опытной пробы, через b — количество миллилитров 0,01 н. марганцовокислого калия, пошедшее на титрование контрольной пробы, то:

$$x = 0,2(a - b) \cdot 50.$$

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРА В КРОВИ

Обычно считают, что в крови х л о р находится в основном в виде хлористого натрия, и поэтому найденное при анализе количество иона хлора пересчитывают на х л о р и с т ы й н а т р и й.

В норме цельная кровь содержит 470—530 мг% хлористого натрия, плазма — около 600 мг% и организм обладает способностью поддерживать относительное постоянство содержания хлористого натрия в крови.

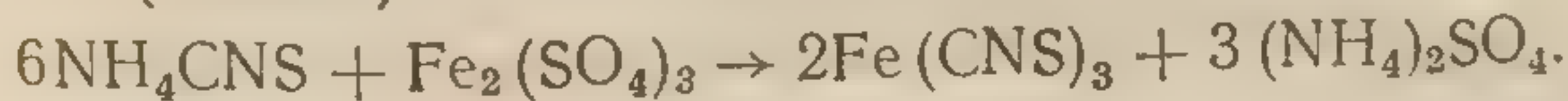
При некоторых заболеваниях количество хлора в крови может значительно уменьшаться или увеличиваться. Так, например, количество хлора значительно уменьшается при обильной рвоте, при переходе хлора из крови в ткани

(при отравлении сулемой), при лихорадке. Наоборот, количество хлора в крови может значительно увеличиваться при заболеваниях почек, в некоторых случаях злокачественных опухолей, при малокровии и т. д.

Метод определения основан на осаждении хлора азотно-кислым серебром в присутствии азотной кислоты. Избыток азотнокислого серебра оттитровывают роданистым аммонием в присутствии железоаммиачных квасцов, являющихся индикатором. Помимо солей, в крови содержится много органических веществ (белки, углеводы, жиры и др.), которые могут осаждаться, образуя соединения с серебром, а в некоторых случаях восстанавливать его до металла. Поэтому определение хлора в присутствии органических веществ крови вести нельзя и их удаляют окислением (путем нагревания с марганцовокислым калием). Органические вещества при этом окисляются до углекислоты и воды, а марганцовокислый калий восстанавливается частью до двухвалентного марганца, частью — до темной бурой перекиси марганца. Избыток перекиси марганца восстанавливают до солей двухвалентного марганца при помощи глюкозы, которая не мешает определению. Реакции осаждения хлора и титрования избытка азотно-кислого серебра идут по следующим уравнениям:



(избыток)



(избыток)

(красного
цвета)

П р и б о р ы. 1. Конические колбочки, 2 шт.

2. Игла для взятия крови.

3. Вата.

4. Марля.

5. Пипетка на 2 мл.

6. Микропипетка на 0,1 мл.

7. Микробюретка.

8. Пипетка на 1 мл с делениями.

Р е а к т и в ы. 1. Азотнокислое серебро, 0,01 н. раствор (приготовление см. стр. 321, п. 2).

2. Марганцовокислый калий, насыщенный раствор.

3. Железоаммиачные квасцы, насыщенный раствор.
4. Роданистый аммоний, 0,01 н. раствор (приготовление см. стр. 331, п. 52).
5. Этиловый спирт.
6. Диэтиловый эфир.
7. Азотная кислота, концентрированная.
8. Глюкоза.

Ход работы

1. В две колбочки вносят пипеткой по 2 мл дистиллированной воды.
 2. Берут из пальца кровь (стр. 78) и в одну из взятых колбочек микропипеткой вносят точно 0,1 мл исследуемой крови. Микропипетку ополаскивают, втягивая и выпуская воду из колбочки. В другую колбочку крови не прибавляют — она служит контролем.
 3. Отмеривают в обе колбочки точно по 2 мл 0,01 н. азотнокислого серебра и добавляют по 0,5 мл концентрированной азотной кислоты, чтобы предотвратить выпадение в осадок других солей серебра (например, фосфорнокислой), которые растворимы в азотной кислоте.
 4. Нагревают (осторожно!) на асбестовой сетке содержимое колбочек до кипения. В обе колбочки прибавляют по каплям раствор марганцовокислого калия (для окисления органических веществ) до появления розового окрашивания, не исчезающего при кипячении в течение 5 минут.
 5. Прекращают нагревание и прибавляют в обе колбочки к горячей и окрашенной жидкости по щепотке глюкозы, после чего окраска должна исчезнуть, вследствие восстановления окрашенных перманганата и перекиси марганца в бесцветный двухвалентный марганец.
 6. Охлаждают колбочки, прибавляют в каждую из них по 4 — 5 капель раствора железоаммиачных квасцов и титруют избыток азотнокислого серебра, оставшийся несвязанным, роданистым аммонием до слабозеленого окрашивания (от роданистого железа, образовавшегося при избытке роданистого аммония).
- Количество хлора во взятой пробе крови соответствует количеству серебра, осажденного в виде AgCl . Таким образом, оно эквивалентно разности между результатом титрования контрольного опыта (б) и количеством миллилитров

0,01 н. роданистого аммония, пошедшего на обратное титрование азотнокислого серебра (a).

Для вычисления содержания хлора в крови в миллиграмм-процентах эту разность умножают на 0,355 (количество миллиграммов хлора, соответствующее 1 мл 0,01 н. раствора роданистого аммония) и на 1 000 (так как определение велось в 0,1 мл крови).

Таким образом, искомое содержание хлора в миллиграммах на 100 мл крови (x) составляет:

$$x = (b - a) \cdot 0,355 \cdot 1\,000 \text{ мг \%}.$$

Если количество хлора нужно выразить в пересчете на хлористый натрий, то вместо коэффициента 0,355 берут коэффициент 0,585 (молекулярный вес хлористого натрия равен 58,5).

* ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ФОСФАТОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

В норме сыворотка крови человека содержит 2,5—5 мг % фосфора в виде неорганических фосфатов. При тетании и некоторых видах почечной недостаточности наблюдается повышенное содержание фосфора в крови. При рахите содержание фосфора в крови понижено.

Определение фосфорной кислоты и ее эфиров в крови и в тканях имеет большое значение в научно-исследовательской работе и является одной из важнейших методик при изучении обмена веществ.

Принцип метода определения фосфора заключается в образовании комплексной фосфорномолибденовой кислоты, которую затем восстанавливают эйконогеном (1, 2, 4—аминонафтолсульфоновокислым натрием) в молибденовую синь. Количество фосфора далее определяют колориметрически по интенсивности окраски.

- П р и б о р ы.
1. Штатив с пробирками.
 2. Пипетка на 10 мл с делениями.
 3. Пипетка на 2 мл.
 4. Воронка с фильтром.
 5. Пипетка на 5 мл.
 6. Пипетка на 1 мл.

7. Мерные колбочки на 10 мл или пробирки с меткой на 10 мл, 2 шт.
8. Колориметр.

- Р е а к т и в ы.
1. Трихлоруксусная кислота, 20% раствор.
 2. Молибденовокислый аммоний, 2,5% раствор в 5 н. серной кислоте (приготовление см. стр. 325, п. 21).
 3. Эйконоген (1, 2, 4 — аминафтол-сульфоновокислый натрий), 0,25% раствор, содержащий сульфит и бисульфит (приготовление см. стр. 334, п. 69).
 4. Фосфорнокислый калий, стандартный раствор, содержащий 0,04 мг фосфора в 1 мл (приготовление см. стр. 333, п. 63).

Х о д р а б о т ы

1. В сухую пробирку отмеривают 6 мл дистиллированной воды, добавляют 2 мл сыворотки и 2 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Перемешивают и отфильтровывают от осадка белка в другую сухую пробирку.

2. 5 мл трихлоруксусного фильтрата (что соответствует 1 мл сыворотки) переносят пипеткой в мерную колбочку. В другую мерную колбочку отмеривают 1 мл стандартного раствора фосфорнокислого калия, 1 мл трихлоруксусной кислоты и 3 мл воды.

3. В обе мерные колбочки (или пробирки) добавляют по 1 мл раствора молибденовокислого аммония и по 0,4 мл раствора эйконогена; перемешивают и оставляют стоять на 15 минут.

4. Через 15 минут содержимое обеих колбочек доводят водой до метки, перемешивают и колориметрируют опытную пробу по стандарту (стр. 118).

Если h_1 — толщина слоя стандартного раствора, а h_2 — толщина слоя испытуемого раствора, то содержание фосфора (в виде неорганических фосфатов) в сыворотке в миллиграмм-процентах составляет:

$$0,04 \cdot 100 \cdot \frac{h_1}{h_2}.$$

ЖЕЛЧЬ

Желчь является секретом печеночных клеток, накапливается в желчном пузыре и выделяется в двенадцатиперстную кишку. Находясь в желчном пузыре, вода из желчи частично всасывается в организм, и последняя вследствие этого концентрируется. Пузырная желчь поэтому более концентрирована, чем печеночная.

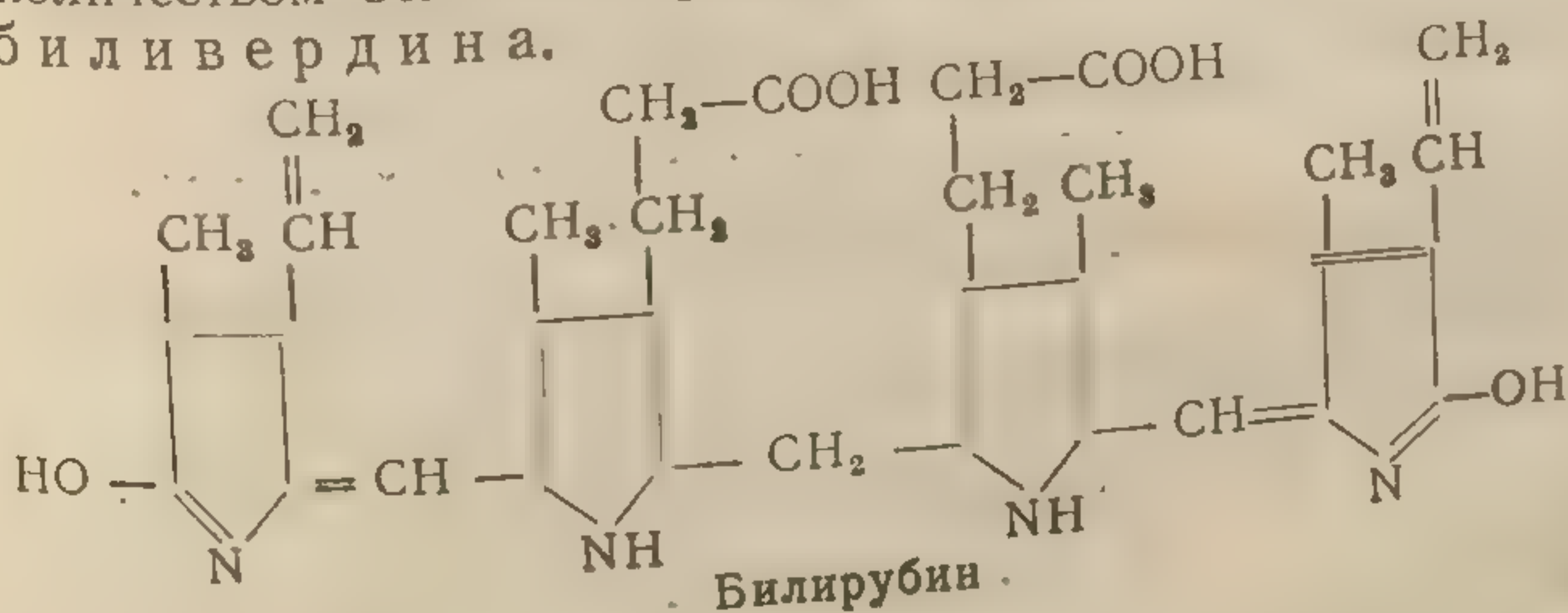
Желчь играет большую роль в пищеварении и всасывании жиров и жирорастворимых витаминов из кишечника, эмульгирует жиры и ускоряет их переваривание, активируя липазу панкреатического сока.

Ряд заболеваний дает общий симптом желтухи, при которой желчь в избыточном количестве циркулирует в крови, вызывая интоксикацию организма и окраску кожи и белков глаз желчными пигментами. Поэтому в клинике большое значение имеет определение желчных пигментов и желчных кислот в моче и крови, а также анализ желчи, отделяемой в двенадцатиперстную кишку.

В состав желчи входят желчные пигменты, желчные кислоты (в виде солей), холестерин, лецитин, мыла и некоторые другие соединения.

РЕАКЦИИ НА ЖЕЛЧНЫЕ ПИГМЕНТЫ

Свежая желчь человека содержит главным образом краснобурый пигмент билирубин, наряду с некоторым количеством зеленого продукта окисления билирубина — биливердина.



Билирубин образуется из гемоглобина при распаде эритроцитов. Железо, отщепленное от гемоглобина, вновь используется организмом, а порфириновое кольцо расщепляется и образует билирубин, который отделяется печенью в составе желчи. Некоторая часть билирубина окисляется при этом в биливердин. При стоянии на воздухе в желчи накапливается значительное количество биливердина.

Благодаря наличию карбоксильных групп желчные пигменты обладают свойствами кислот; они образуют растворимые соли с щелочными металлами и нерастворимые — с щелочноземельными металлами.

Качественные реакции на желчные пигменты основаны на получении окрашенных в различные цвета продуктов окисления билирубина. Продуктами окисления билирубина являются: биливердин (зеленого цвета), билицианин (синего цвета), холетелин (желтого цвета) и некоторые другие.

В пробах Гупперт-Сальковского и Маслова желчные пигменты сначала осаждают в виде кальциевой или бариевой соли и потом открывают в спиртовом растворе.

П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.

2. Воронка.

3. Кусок стекла.

4. Стеклянная палочка.

5. Водяная баня.

6. Фарфоровая чашка.

7. Пипетка.

8. Фильтровальная бумага.

Р е а к т и в ы. 1. Желчь, разведенная водой в 5 раз.

2. Азотная кислота, концентрированная, содержащая следы азотистой кислоты (при стоянии на свету азотная кислота всегда содержит примесь азотистой кислоты).

3. Углекислый натрий, 10% раствор.

4. Хлористый кальций, 3% раствор.

5. Этиловый спирт.

6. Соляная кислота, концентрированная.

7. Уксусная кислота, 25% раствор.

8. Хлористый барий, 5% раствор.

9. Азотная кислота, 0,5% раствор в спирте.

10. Перекись водорода, 3% раствор.

Ход работы

I. Проба Гмелина

Наливают в пробирку около 1 мл разбавленной желчи и осторожно по стенке подслаивают равный объем концентрированной азотной кислоты. На границе жидкостей образуется осадок желчных кислот и белка и цветные кольца желчных пигментов. Характерно наличие зеленого, синего, фиолетового, красного и желтого колец в указанной последовательности, что соответствует разным степеням окисления пигмента.

II. Проба на фильтровальной бумаге

1. Несколько раз профильтровывают желчь через небольшой фильтр. В результате фильтрования на фильтре частично задерживаются желчные пигменты.

2. Развертывают фильтр на куске стекла и в центр фильтра помещают при помощи стеклянной палочки каплю концентрированной азотной кислоты. Появляются цветные кольца желчных пигментов; зеленое кольцо располагается снаружи.

III. Проба Гупперт-Сальковского

1. Наливают в пробирку 2—3 мл разбавленной желчи и добавляют 1—2 мл раствора соды.

2. Прибавляют 1 — 2 мл раствора хлористого кальция. Выпадает желтый осадок, который состоит из углекислого кальция и адсорбированных на нем кальциевых солей билирубина и биливердина. Осадок отфильтровывают.

3. Подставляют под воронку с фильтром чистую пробирку и осторожно растворяют осадок на фильтре несколькими каплями концентрированной соляной кислоты. Углекислый кальций при этом полностью растворяется, а желчные пигменты переходят в свободное состояние и остаются на фильтре.

4. Наливают на фильтр 3 — 4 мл спирта. Пигменты при этом растворяются и фильтруются со спиртом и кислотой в пробирку.

5. Кипятят содержимое пробирки в нагретой до кипения водяной бане. Зеленое или синее окрашивание указывает на присутствие желчных пигментов.

IV. Проба Маслова

1. В пробирку наливают 2 — 3 мл разведенной желчи, подкисляют ее 4—6 каплями раствора уксусной кислоты и добавляют равный объем раствора хлористого бария.

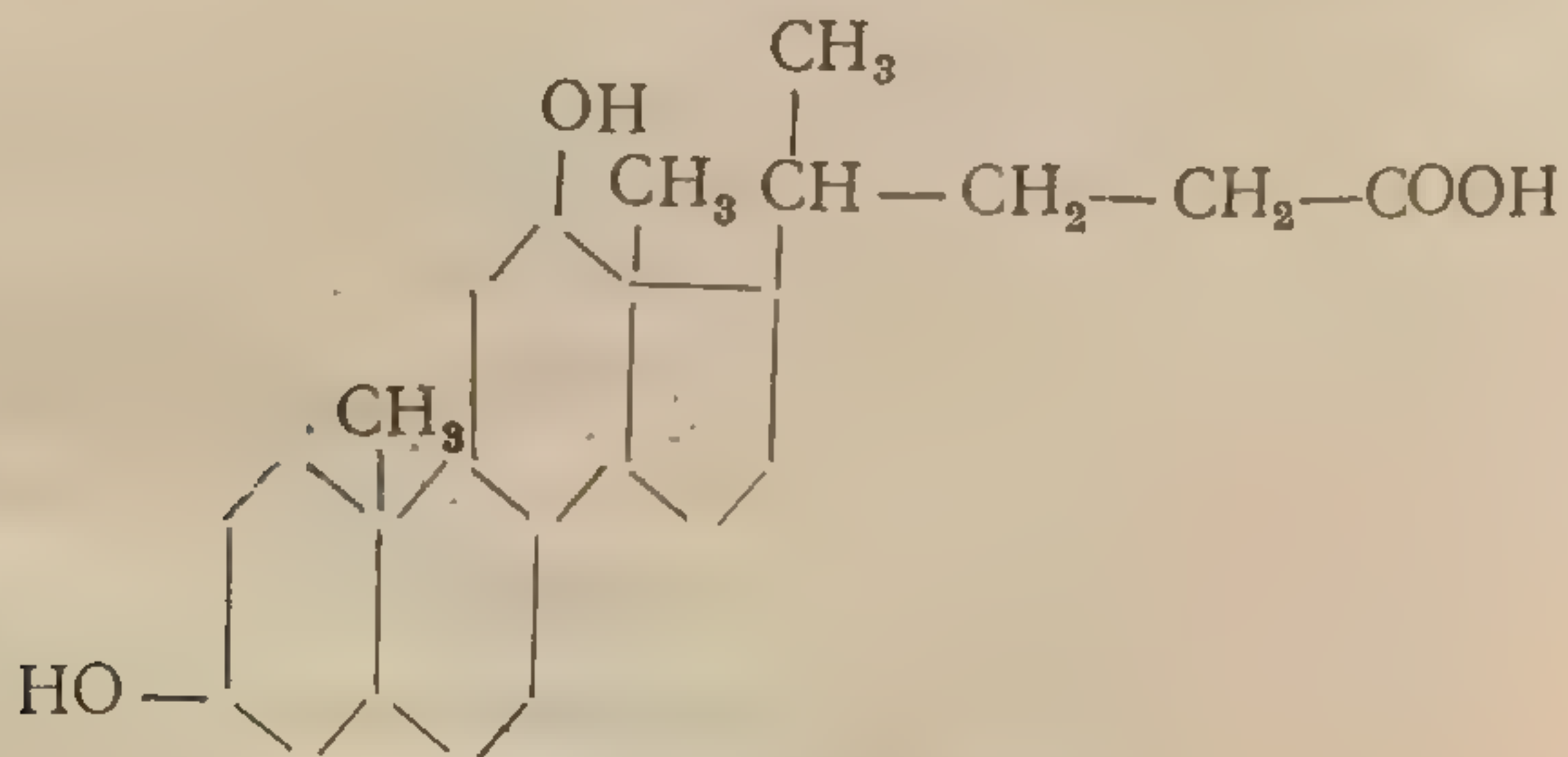
2. Перемешивают и осторожно кипятят содержимое пробирки. Горячий раствор фильтруют.

3. Фильтр с желтым осадком переносят в фарфоровую чашку, разворачивают его и смывают 2—3 мл раствора азотной кислоты в спирте, снимая осадок стеклянной палочкой.

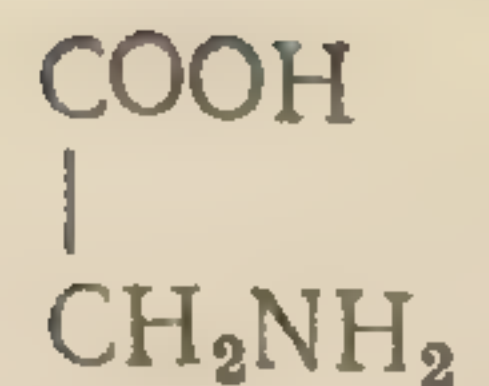
4. Раствор азотной кислоты в спирте вместе с нерастворившимся осадком сливают в чистую пробирку, добавляют 4 — 5 капель раствора перекиси водорода и кипятят в водяной бане. Через 2 — 3 минуты белый осадок бариевых солей оседает на дно пробирки; сине-зеленая окраска прозрачного раствора указывает на присутствие желчных пигментов.

РЕАКЦИИ НА ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ

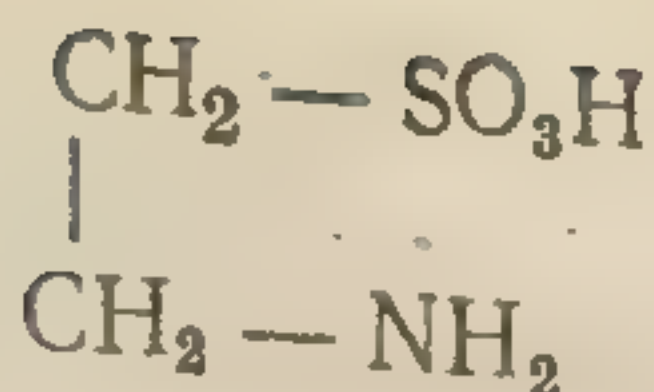
Желчные кислоты являются важной составной частью желчи. По своему химическому строению они близки к холестерину и другим стеринам. Наиболее распространенной является холевая кислота, которая содержит три гидроксильные группы. Наряду с холевой кислотой, известны дезоксихолевая и другие желчные кислоты. В желчи указанные кислоты соединены с аминокислотой глицином (гликолом) или с таурином (производное цистеина) пептидной связью и находятся в виде солей (главным образом натриевых).



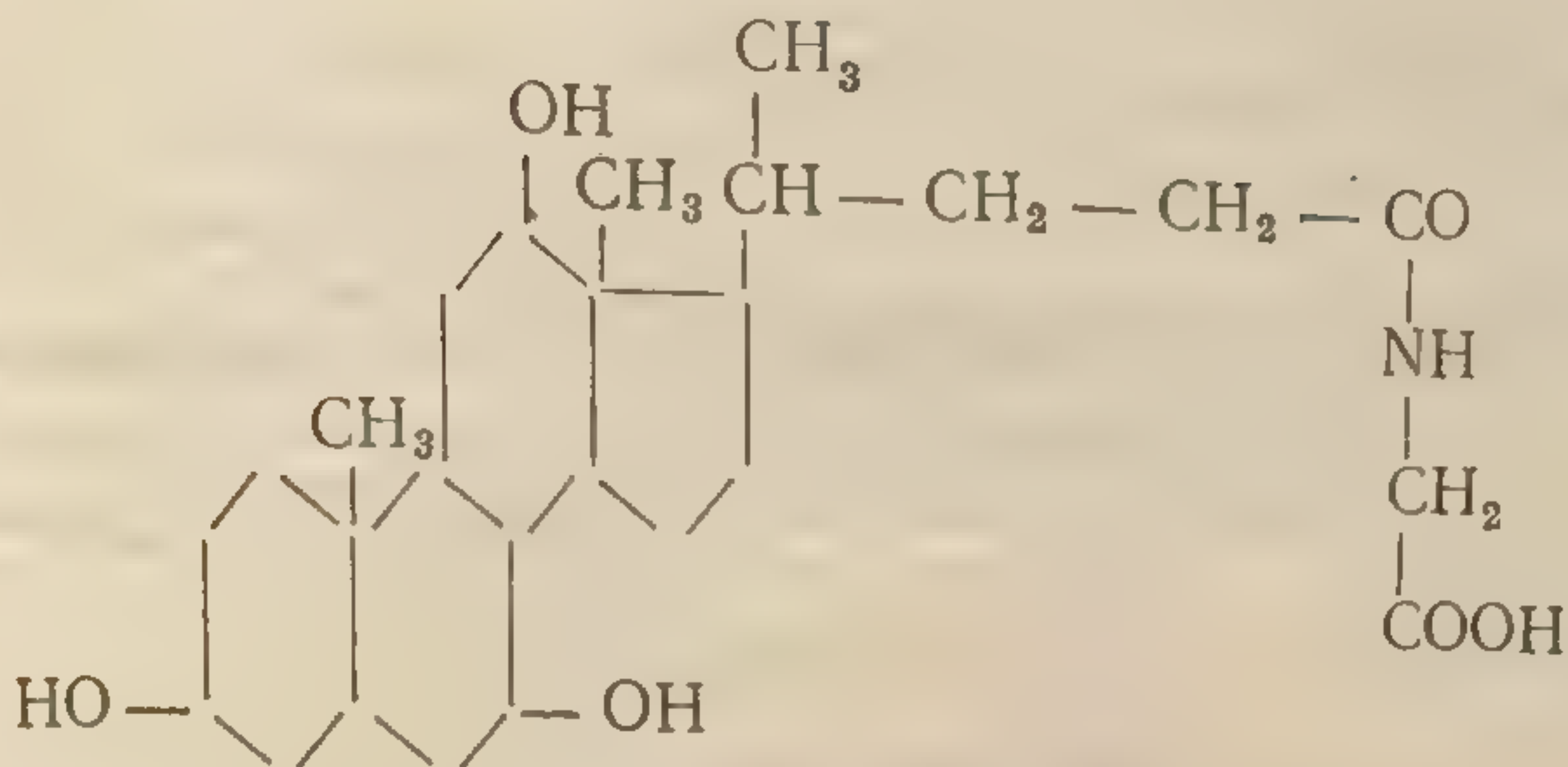
Дезоксихолевая кислота



Глицин
(гликокол)



Таурин



Гликохолевая кислота

Желчные кислоты легко образуют парные соединения с жирными кислотами, чем способствуют их всасыванию.

В желчи человека преобладают гликохолевые кислоты (соединения холевой, дезоксихолевой и антроподезоксихолевой кислот с глицином). В желчи быка и других травоядных большая часть желчных кислот соединена с таурином (таурохолевые кислоты).

Присутствие желчных кислот можно открыть по их свойству понижать поверхностное натяжение, а также специальной реакцией Петтенкоффера. Эта реакция состоит в воздействии на желчные кислоты крепкой серной кислотой в присутствии сахара. Из сахарозы образуется оксиметилфурфурол (стр. 135), который дает пурпурное окрашивание с желчными кислотами.

П р и б о р ы. Штатив с пробирками.

Р е а к т и в ы. 1. Желчь, разведенная водой в 5 раз.
2. Сахароза, 5% раствор.
3. Серная кислота, концентрированная.
4. Серный цвет.

Ход работы

I. Реакция Петтенкофера

1. Наливают в пробирку 2 — 3 мл разведенной желчи, прибавляют к ней 1 — 2 капли раствора сахара и слегка встряхивают.

2. По стенке пробирки подслаивают 1 — 2 мл крепкой серной кислоты (осторожно!).

В месте соприкосновения с кислотой появляется пурпурно-красное окрашивание, которое при осторожном перемешивании (при охлаждении) распространяется на все содержимое пробирки.

В присутствии белка эта реакция не надежна, так как белки в этих условиях дают очень сходное окрашивание. Для того чтобы установить наличие желчных кислот в присутствии белка, пользуются спектроскопическим исследованием.

II. Проба на понижение поверхностного натяжения

1. В одну пробирку наливают 9 — 10 мл разведенной желчи, в другой — 8 — 9 мл воды смешивают с 0,5 — 1 мл разведенной желчи, в третью — наливают 9 — 10 мл воды.

2. Все три пробирки ставят на 5 — 6 минут в холодную воду, затем на поверхность жидкости насыпают порошок серного цвета.

В чистой воде сера остается плавать на поверхности, в сильно разведенной желчи опускается на дно, а в слабо разведенной опускается на дно еще быстрее вследствие того, что желчь понижает поверхностное натяжение.

ОБНАРУЖЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА В ЖЕЛЧНЫХ КАМНЯХ

Желчные камни, в особенности у человека, обычно содержат значительное количество холестерина (стр. 114), достигающее иногда до 90%.

П р и б о р ы. 1. Штатив с сухими пробирками.

2. Ступка с пестиком.

3. Воронка с сухим фильтром.

4. Фарфоровая чашечка.

5. Водяная баня.

6. Предметное стекло.

7. Стеклянная палочка.

8. Микроскоп.

- Р е а к т и в ы.
1. Желчные камни.
 2. Диэтиловый эфир.
 3. Этиловый спирт.
 4. Хлороформ.
 5. Серная кислота, концентрированная.
 6. Серная кислота удельного веса 1,82 (приготовление см. стр. 332, п. 54).
 7. Уксусный ангидрид.

Х о д р а б о т ы

1. Около 0,2 г желчных камней растирают в ступке с 8 — 10 мл эфира и отфильтровывают в сухую фарфоровую чашечку.

2. В чашечку добавляют 4 — 5 мл спирта и упаривают раствор на водяной бане до выпадения кристаллов холестерина.

3. Еще сырые кристаллы наносят стеклянной палочкой на предметное стекло и рассматривают под микроскопом (рис. 8, стр. 116).

4. Кристаллы холестерина в чашечке растворяют в 10 — 20 мл хлороформа и с полученным раствором проводят реакции с серной кислотой и с уксусным ангидридом (стр. 116).

ЖЕЛУДОЧНЫЙ СОК ¹

В желудочном соке человека обычно содержится вода, соляная кислота, хлористый натрий, кислые фосфорнокислые соли и ряд органических соединений, из которых отметим белковые вещества и ферменты пепсин и липазу.

Для клинического исследования желудочный сок (желудочное содержимое) обычно берут при помощи толстого зонда через 45—50 минут после пробного завтрака, состоящего из 50 г черствого белого хлеба и двух стаканов воды.

При взятии желудочного содержимого для исследования туда обычно попадает слюна, пища и продукты ее переваривания. В ряде случаев возможно наличие в желудочном содержимом также молочной, масляной, уксусной и валериановой кислот.

Эти органические кислоты попадают в желудочный сок с пищей или образуются в желудке в результате брожения.

Благодаря присутствию соляной кислоты желудочный сок (желудочное содержимое) почти всегда имеет резко кислую реакцию ($\text{pH} = 1,3—2,5$). Все кисло реагирующие вещества желудочного сока (свободная и связанная соляная кислота, органические кислоты и кислые фосфорнокислые соли) обозначают термином «общая кислотность». Соляную кислоту, находящуюся в солеобразном соединении с белками и продуктами их переваривания, условно называют «связанная соляная кислота»; несвязанную соляную кислоту — «свободная соляная кислота». Сумму связанной и свободной соляной кислоты обозначают термином «общая соляная кислота».

Ориентировочно кислотность желудочного сока устанавливают с помощью индикаторов. Отсутствие кислой реакции на лакмус говорит о полном отсутствии кислот. Кислая реакция на лакмус еще не указы-

¹ Выделение и состав желудочного сока подробно изучены И. П. Павловым и его учениками.

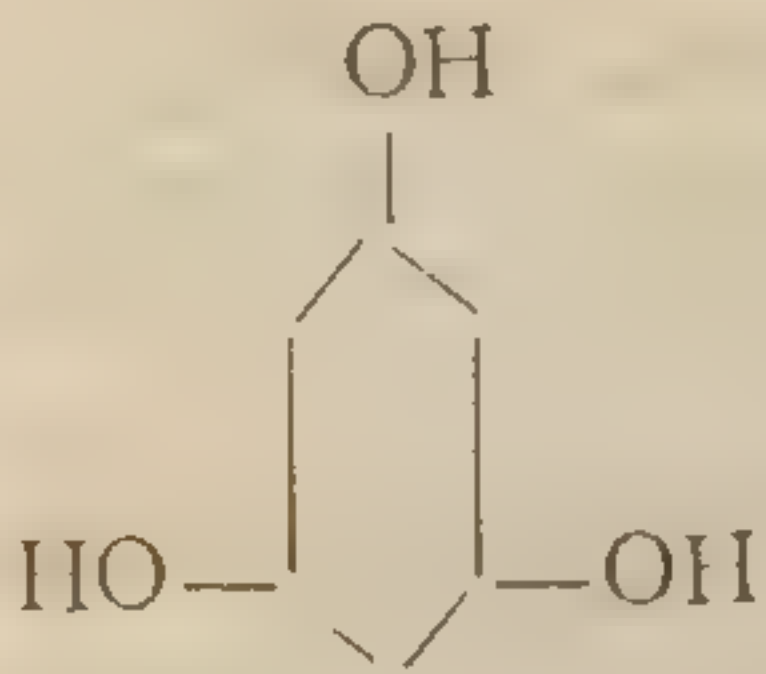
вае на присутствие свободной соляной кислоты, которую обнаруживают специальными индикаторами. Количество кислот определяют титрованием 0,1 н. щелочью. Присутствие молочной кислоты, крови, желчи и других продуктов в желудочном содержимом обнаруживают специальными реакциями.

РЕАКЦИИ НА СВОБОДНУЮ СОЛЯНУЮ КИСЛОТУ

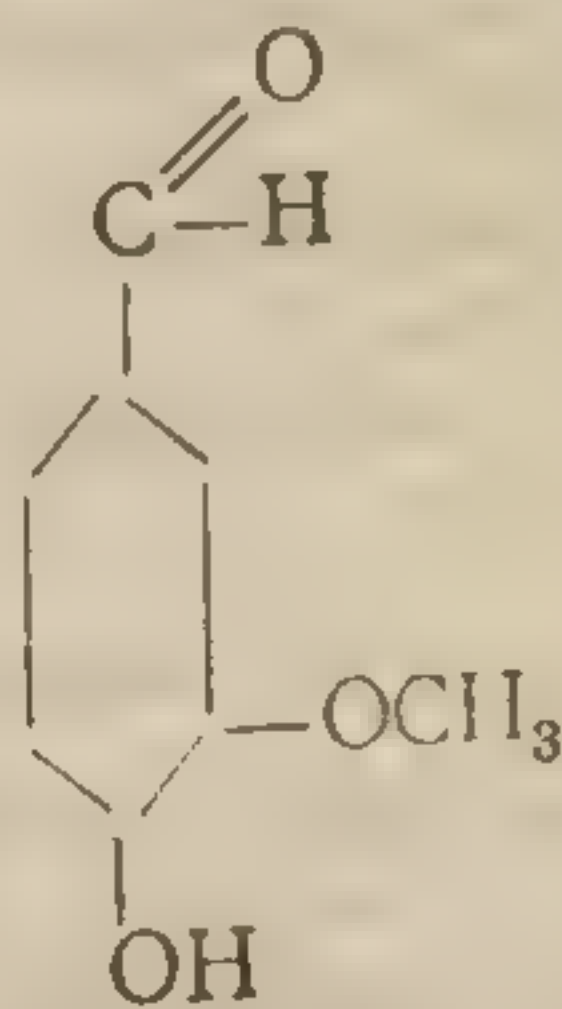
Нормальный желудочный сок всегда содержит свободную соляную кислоту. Последнюю можно обнаружить по сильно кислой реакции (рН ниже 3,0). Связанная соляная кислота, органические кислоты и кислые реагирующие соли дают лишь слабокислую реакцию. Для открытия свободной соляной кислоты обычно пользуются красным конго и парадиметиламиноазобензолом, а также флороглюцин-ванилином.

Зона изменения цвета конго лежит при $\text{pH} = 3,0-5,2$. В кислой среде конго синего цвета, в щелочной и нейтральной — красного. Благодаря этому красное конго переходит в синее только под влиянием сильных — минеральных — кислот. От разбавленных органических кислот и кислых солей цвет конго не меняется.

Зона изменения цвета парадиметиламиноазобензола лежит при $\text{pH} = 2,9-4,0$. В щелочной и нейтральной среде эта краска желтого цвета. В сильно кислой среде, т. е. в присутствии свободных минеральных кислот, она красная.



Флороглюцин



Ванилин

Реакция с флороглюцин-ванилином наиболее специфична. Она заключается в появлении пурпурно-красного окрашивания при выпаривании этого реактива в присутствии свободной соляной кислоты.

Молочная кислота с флороглюцин-ванилином не дает никакого окрашивания.

П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.
2. Фарфоровая крышечка от тигля.
3. Стеклянная палочка.

Р е а к т и в ы. 1. Бумажка конго, красная.
2. Парадиметиламиноазобензол, 0,5% раствор в спирте.
3. Флороглюцин-ванилиновый реактив (приготовление см. стр. 333, п. 61).
4. Желудочный сок, профильтрованный.
5. Соляная кислота, 0,2% раствор.

Х о д р а б о т ы

I. Реакция с бумажкой конго

1. На красную бумажку конго наносят стеклянной палочкой каплю раствора соляной кислоты. Наблюдают появление синего окрашивания.

2. Проделывают эту реакцию с желудочным соком вместо раствора соляной кислоты. Синее окрашивание указывает на присутствие в желудочном соке свободной соляной кислоты. Фиолетовое окрашивание может дать молочная и другие органические кислоты.

II. Реакция с парадиметиламиноазобензолом

1. Несколько капель раствора соляной кислоты помещают в пробирку и добавляют 1—2 капли раствора парадиметиламиноазобензола. Наблюдают появление красного окрашивания.

2. Проделывают эту реакцию с желудочным соком. Присутствие свободной соляной кислоты обнаруживается по красному окрашиванию. Органические кислоты могут окрасить индикатор в оранжевый цвет.

III. Реакция с флороглюцин-ванилином

1. На крышку от тигля наносят 2—3 капли флороглюцин-ванилинового реактива и 1—2 капли раствора соляной кислоты. Перемешивают и осторожно (без кипячения) выпаривают досуха. Наблюдают появление красного окрашивания.

2. Проделывают эту же реакцию, взяв вместо раствора соляной кислоты желудочный сок. В присутствии свободной соляной кислоты появляется красное окрашивание.

РЕАКЦИЯ НА МОЛОЧНУЮ КИСЛОТУ

Молочная кислота является патологической составной частью желудочного сока (например, при раке желудка). Небольшие количества молочной кислоты могут, однако, попадать в желудок с пищей (например, с хлебом) в норме.

Молочную кислоту открывают реакцией с раствором фенола, содержащим хлорное железо.

При смешивании хлорного железа с фенолом появляется аметистово фиолетовое окрашивание, благодаря образованию комплексного фенолята железа.

В присутствии молочной кислоты и других слабых кислот образуется малодиссоциированная соль железа и окраска становится зелено-желтой. Ряд веществ, образующих с железом комплексные соединения (спирт, сахар, фосфаты), могут встречаться в желудочном соке и давать положительную реакцию на молочную кислоту.

Сильные кислоты, в том числе соляная, полностью разрушают комплекс железа с фенолом и дают бесцветный раствор. Помимо этого, соляная кислота вытесняет более слабую молочную кислоту из ее железной соли; поэтому реакция менее чувствительна, когда в желудочном содержимом находится и соляная кислота. В сомнительных случаях молочную кислоту предварительно экстрагируют из желудочного сока эфиром. Этот прием и то обстоятельство, что в значительном количестве молочная кислота обычно присутствует в желудочном соке лишь при отсутствии соляной кислоты, делают реакцию на молочную кислоту практически вполне применимой.

- П р и б о р ы.
1. Штатив с пробирками.
 2. Пипетка.
 3. Мерный цилиндр.
 4. Водяная баня.
 5. Стаканчик.

- Р е а к т и в ы.
1. Фенол, 1% раствор.
 2. Хлорное железо, 1% раствор.
 3. Желудочный сок, профильтрованный.
 4. Молочная кислота, 0,1% раствор.
 5. Соляная кислота, 0,2% раствор.
 6. Диэтиловый эфир.

Ход работы

I. 1. Приготавливают реактив на молочную кислоту. Для этого приблизительно к 15 мл раствора фенола добавляют несколько капель хлорного железа и взбалтывают. Жидкость окрашивается в аметистово-фиолетовый цвет. Реактив разводят водой до слабой окраски.

2. В три пробирки наливают по 2—3 мл реактива на молочную кислоту.

3. В первую пробирку добавляют по каплям раствор молочной кислоты, во вторую пробирку — профильтрованный желудочный сок и в третью — раствор соляной кислоты.

Реакция с содержимым первой пробирки будет положительной, т. е. окраска перейдет в зелено-желтую, благодаря образованию желтого молочнокислого железа и частичному разрушению комплексного фенолята. Во второй пробирке реакция получится только в том случае, если имеется молочная кислота, а соляная кислота или отсутствует, или содержится в незначительном количестве. В третьей пробирке раствор обесцвечивается (реакция отрицательная).

II. 1. В пробирку наливают 2—3 мл профильтрованного желудочного сока, добавляют 8—10 мл эфира и взбалтывают (при работе с эфиром все горелки в комнате должны быть потушены).

2. Верхний эфирный слой пипеткой переносят в небольшой стаканчик.

3. Эфир из стаканчика осторожно выпаривают на заранее нагретой водяной бане.

4. Остаток растворяют в 1—2 мл дистиллированной воды и проделывают вышеописанную реакцию на молочную кислоту¹.

ТИТРОВАНИЕ КИСЛОТ ЖЕЛУДОЧНОГО СОДЕРЖИМОГО

При клиническом анализе желудочного содержимого важнейшее значение имеет содержание кислот. Повышенная кислотность желудочного сока может указывать на язву желудка или гиперацидный гастрит. Пониженная кислотность встречается при ряде желудочно-кишечных заболеваний (гипоацидный гас-

¹ Присутствие летучих жирных кислот — уксусной, масляной и валериановой — узнается обычно по их характерному запаху.

рит и др.) и при раке. Кислоты желудочного сока, всасываясь в кровь, играют большую роль в кислотно-щелочном равновесии организма (стр. 224). Так, например, обильная рвота (с потерей соляной кислоты) приводит к алкалозу (стр. 226 и 272).

Кислотность желудочного сока (содержимого) обычно выражают в количестве миллилитров точно 0,1 н. щелочи, идущей на титрование 100 мл профильтрованного желудочного содержимого.

Под «общей кислотностью» желудочного сока понимают все кисло реагирующие вещества желудочного содержимого. Под «свободной соляной кислотой» — свободную минеральную кислоту. Под «связанной соляной кислотой» — кисло реагирующие хлористые соли белков и других слабых оснований. Под «общей соляной кислотой» — сумму свободной и связанной соляной кислоты.

В норме общая кислотность профильтрованного желудочного содержимого человека после стандартного пробного завтрака лежит в пределах от 40 до 60. Свободная соляная кислота — от 20 до 40.

Количество свободной соляной кислоты в желудочном соке иногда выражают и в процентах, исходя из того, что 1 мл 0,1 н. щелочи эквивалентен 1 мл 0,1 н. соляной кислоты, а в 1 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты содержится 0,00365 г хлористого водорода; поэтому, умножая 0,00365 на количество миллилитров 0,1 н. щелочи, идущее на титрование 100 мл желудочного содержимого, узнают процентное содержание соляной кислоты в исследуемом желудочном соке.

Раздельное титрование кислот желудочного содержимого достигается путем применения индикаторов с разными зонами перехода окраски. Только при титровании сильной кислоты сильным основанием имеет место резкий скачок рН (рис. 35, кривая А) и можно пользоваться различными индикаторами.

При титровании слабой кислоты сильным основанием (рис. 35, кривая Б) изменение рН происходит более постепенно и нейтральная реакция ($\text{pH} = 7$) достигается значительно раньше, чем оттитрована вся кислота. Точка же эквивалентности, т. е. пункт, при котором количество сильного основания, пошедшего на титрование, эквивалентно количеству слабой кислоты, лежит в слабо щелочной среде. Поэтому в этих случаях пользуются инди-

каторами с зоной перехода окраски в слабо щелочной среде (например, фенолфталеином, зона перехода $pH=8,2-10,0$).

При титровании сильной кислоты слабым основанием (рис. 35, кривая *В*) наблюдается обратная картина—точка эквивалентности лежит в кислой среде и для ее установления нужно пользоваться соответствующим индикатором (конго, диметиламиноазобензол).

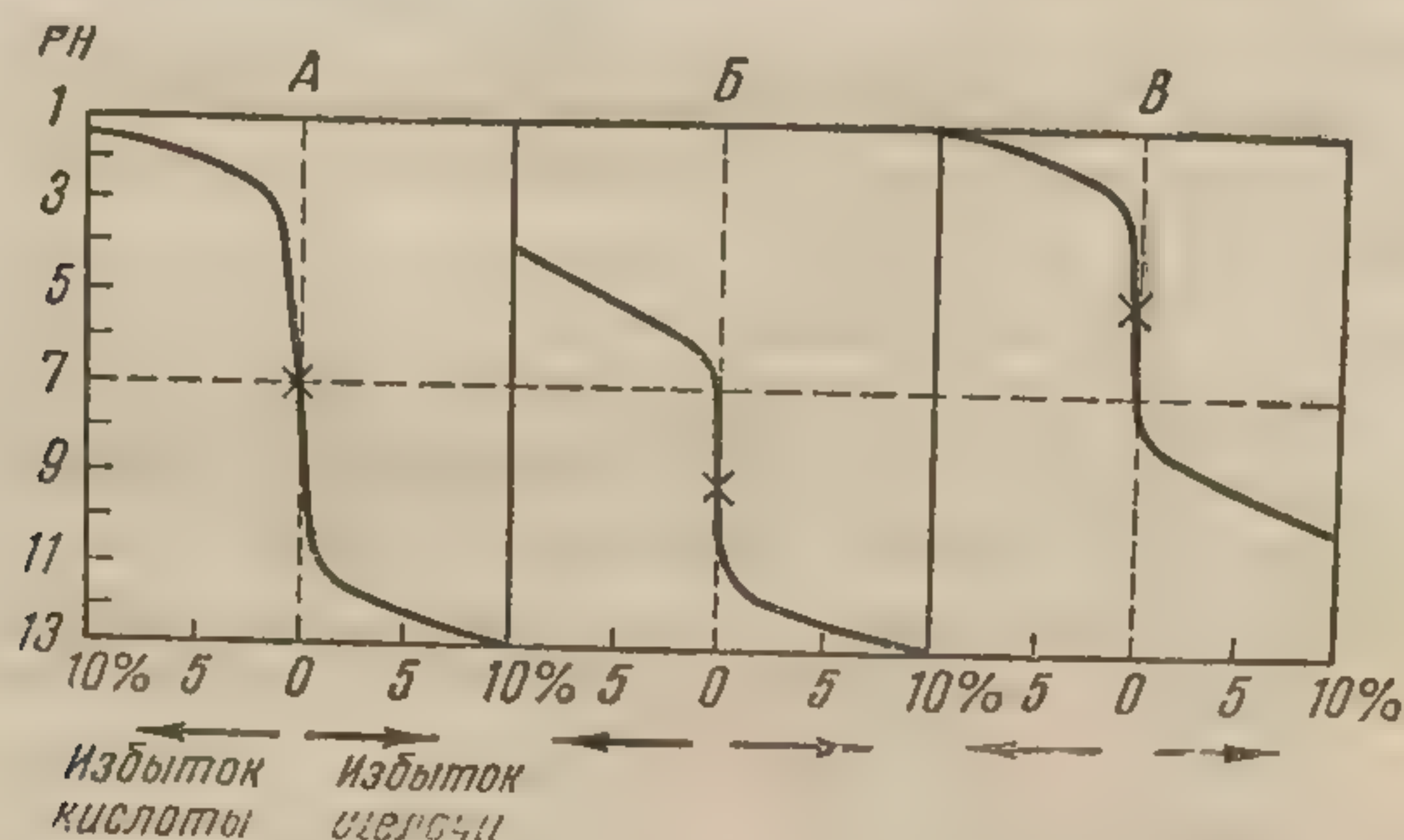


Рис. 35. Кривые нейтрализации.

А—сильной кислоты сильной щелочью; *Б*—слабой кислоты сильной щелочью; *В*—слабого основания сильной кислотой; *Х*—точка эквивалентности кислоты и щелочи.

Средняя горизонтальная пунктирная линия отвечает нейтральной среде.

Так как для определения общей кислотности нужно оттитровать все кислоты и кисло реагирующие соли желудочного содержимого, то точка эквивалентности лежит в щелочной среде (рис. 35, кривая *Б*) и для ее установления пользуются фенолфталеином. Если нужно оттитровать только свободную соляную кислоту, в качестве индикатора применяют парадиметиламиноазобензол (зона перехода $pH = 2,9 - 4,0$), чтобы титрованию не мешали слабые кислоты. Ализаринсульфоновокислый натрий (красный ализарин, зона перехода $pH = 5,0 - 6,8$) дает возможность оттитровать свободные соляную и органические кислоты и, вычитая полученный результат из результата титрования общей кислотности, определить содержание связанной соляной кислоты. Путем комбинации нескольких индикаторов в одной пробе можно оттитровать сразу свободную соляную кислоту и общую кислотность или даже общую кислотность, свободную соляную кислоту и связанную соляную кислоту.

П р и б о р ы. 1. Коническая колбочка.

2. Пипетка на 10 мл.

3. Бюретка.

Р е а к т и в ы. 1. Желудочный сок, профильтрованный.

2. Едкий натр, 0,1 н. раствор.

3. Фенолфталеин, 0,5% раствор в спирте.

4. Парадиметиламиноазобензол, 0,5% раствор в спирте.

5. Ализарин красный (ализаринсульфоновокислый натрий), 1% раствор.

Х о д р а б о т ы

I. Определение общей кислотности

1. В коническую колбочку отмеривают 10 мл желудочного сока и прибавляют 1—2 капли раствора фенолфталеина.

2. Оттитровывают содержимое колбочки 0,1 н. раствором едкого натра до появления розового окрашивания.

Результат титрования умножают на 10 (для расчета на 100 мл) и получают величину, выражающую общую кислотность желудочного сока (в миллилитрах 0,1 н. щелочи).

II. Определение свободной соляной кислоты

1. Отмеривают пипеткой в колбочку 10 мл профильтрованного желудочного сока и прибавляют 1—2 капли раствора парадиметиламиноазобензола.

2. Титруют содержимое колбочки раствором едкого натра до появления желтовато-красного окрашивания.

Результаты титрования умножают на 10. Произведение дает количество свободной соляной кислоты в желудочном содержимом, выраженное в количестве миллилитров 0,1 н. раствора щелочи на 10 мл желудочного сока.

III. Определение свободной соляной кислоты и общей кислотности в одной пробе

1. Отмеривают пипеткой в колбочку 10 мл исследуемого желудочного сока и добавляют 1—2 капли парадиметиламиноазобензола.

2. Титруют раствором едкого натра до появления желтовато-красного окрашивания. Отмечают количество мил-

лилитров щелочи, пошедшее на титрование (первый пункт).

3. Прибавляют в ту же колбочку 1—2 капли раствора фенолфталеина и продолжают титрование до появления не исчезающего розового окрашивания. Отмечают общее количество миллилитров щелочи, пошедшее на оба титрования (второй пункт).

Количество миллилитров щелочи, пошедшее на титрование до первого пункта, умноженное на 10, дает «свободную соляную кислоту»; общее количество щелочи (до второго пункта), умноженное на 10, выражает «общую кислотность».

IV. Определение связанной соляной кислоты

1. Отмеривают пипеткой в колбочку 10 мл профильтрованного желудочного сока и прибавляют 4—5 капель раствора ализаринсульфоновокислого натрия.

2. Титруют раствором едкого натра до появления фиолетового окрашивания.

3. Одновременно определяют общую кислотность (с фенолфталеином). «Связанную соляную кислоту» вычисляют путем вычитания результата титрования с красным ализарином из результата титрования общей кислотности и умножения на 10.

Например, если на титрование общей кислотности пошло 5,20 мл раствора щелочи, а на титрование с ализаринсульфоновокислым натрием — 4,05 мл, то на связанную соляную кислоту приходится $5,20 - 4,05 = 1,15$ мл 0,1 н. щелочи, т. е. для кислотности «связанной соляной кислоты» мы получаем величину 11,5.

Определив количество свободной и связанной соляной кислоты, можно вычислить и общее количество соляной кислоты в желудочном соке.

V. Определение общей кислотности, свободной и связанной соляной кислоты в одной пробе

1. Отмеривают пипеткой в колбочку 10 мл профильтрованного желудочного сока. Добавляют 1—2 капли парадиметиламиноазобензола и 2 капли фенолфталеина.

2. Титруют 0,1 н. раствором едкого натра до желтоватокрасного окрашивания (первый пункт), далее продолжают титрование до лимонножелтого цвета (второй пункт) и,

наконец, до появления розового окрашивания (третий пункт). Первый пункт соответствует свободной соляной кислоте. Среднее арифметическое между вторым и третьим пунктами считают соответствующим общей соляной кислоте и третий пункт — общей кислотности желудочного сока.

В качестве примера допустим, что при титровании 0,1 н. щелочью затрачено титрованного раствора (с начала титрования):

до первого пункта (желтовато-красный цвет)	. . .	4,10	мл
» второго » (лимонножелтый цвет)	. . .	4,44	»
» третьего » (розовый цвет)	6,36	»

Среднее между вторым и третьим пунктом:

$$\frac{4,44 + 6,36}{2} = 5,40 \text{ мл.}$$

Следовательно:

свободная соляная кислота	$4,10 \cdot 10 = 41,0$
общая соляная кислота	$5,40 \cdot 10 = 54,0$
связанная соляная кислота	$54,0 - 41,0 = 13,0$
общая кислотность	$6,36 \cdot 10 = 63,6$

Этот способ неприменим при наличии молочной кислоты в желудочном соке.

РЕАКЦИЯ НА КРОВЬ В ЖЕЛУДОЧНОМ СОКЕ

Свежая алая кровь (оксигемоглобин) в только что взятом желудочном содержимом еще не указывает на наличие кровоточащей язвы, так как оболочка желудка могла быть повреждена зондом. Присутствие побуревшей крови (солянокислый гемин) в только что полученном желудочном соке может служить весьма существенным указанием на изъязвление стенок желудка, если исключена возможность наличия проглоченной крови.

Присутствие крови обычно устанавливают не только немедленным осмотром желудочного содержимого, но и с помощью бензидиновой пробы (стр. 236), причем для исследования берется прокипяченный нефилтрованный желудочный сок.

ОТКРЫТИЕ ЖЕЛЧИ В ЖЕЛУДОЧНОМ СОКЕ

Желчь может попасть в желудочное содержимое вследствие обратной перистальтики кишечника. О присутствии желчи обычно узнают по характерной травянисто-зеленой или желтой окраске желудочного сока. Желчные пигменты определяют в нефилтрованном желудочном содержимом (стр. 251).

Сос
в дово
ние со
также
ставны
пигмен
ного и

Пом
разова
чой в
нераль

Сос
и рабо

Ко
в дово
однако
сла

При
ложен
с поя
же све
ную р
чевин

С у
челове
висит
жима.
мочи.
и 1 20
быть

1
В. С.

МОЧА

Состав отдельных порций мочи колеблется в норме в довольно широких пределах. Однако изменение содержания ряда ингредиентов в суточной моче, а также появление заметных количеств патологических составных частей, как, например, сахара, белка, желчных пигментов и др., характеризуют состояние здоровья больного и являются важнейшим критерием для лечения¹.

Помимо воды, как введенной в организм извне, так и образовавшейся при окислении органических веществ, с мочой выделяются продукты распада азотистых веществ, минеральные, различные лекарственные и другие вещества.

Состав мочи человека при обычных условиях питания и работы приведен в табл. XII (стр. 344).

Концентрация водородных ионов в моче колеблется в довольно широких пределах (от $pH = 5$ до $pH = 7$), однако обычно свежесвыпущенная моча человека имеет слабнокислую реакцию на лакмус (pH около 6). При стоянии мочи реакция ее становится щелочной (разложение мочевины под влиянием уреазы микроорганизмов с появлением аммиака). При катаррах мочевого пузыря даже свежесвыпущенная моча человека может иметь щелочную реакцию, благодаря действию уреазы бактерий на мочевину.

Суточное количество мочи, выделяемое человеком, может колебаться в широких пределах, что зависит от ряда условий, главным образом от питьевого режима. В среднем человек выделяет в сутки 1 000—1 600 мл мочи. Обычно за норму принимают 1 500 мл для мужчин и 1 200 мл для женщин. В патологических случаях может быть полное прекращение выделения мочи (анурия),

¹ Химия мочи и методы ее исследования подробно изложены В. С. Гулевиным в его книге «Анализ мочи».

уменьшенное выделение (олигурия) или повышенное выделение мочи (полиурия).

При исследовании мочи часто хотят узнать не процентное содержание в ней какой-либо составной части, а количество того или иного вещества, которое выделяется с мочой за сутки. Так как разные порции мочи имеют неодинаковый состав, то естественно, что для анализа в этом случае нужно собрать всю мочу за сутки.

Для этого в определенное время (например, в 7 часов утра) исследуемый выпускает мочу. Эту мочу отбрасывают. В дальнейшем всю мочу собирают в чистый сосуд, в который добавляют немного толуола для антисептики. Последнюю порцию мочи собирают в 7 часов утра следующего дня. Собранную мочу заливают толуолом и хранят в холодном месте.

В ряде случаев для анализа берут несколько отдельных порций мочи (утреннюю, вечернюю и т. п.), а для определения легко разлагающихся веществ (ацетоксусная кислота, витамин С и др.) — только свежевыпущенную мочу.

Перед анализом исследуемую мочу необходимо тщательно перемешивать.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УДЕЛЬНОГО ВЕСА МОЧИ

Удельный вес нормальной мочи при температуре 15° составляет 1,010—1,025.

Определение удельного веса мочи имеет большое диагностическое значение при сахарной болезни, нарушениях функции почек и ряде других заболеваний. Удельный вес мочи зависит также от количества потребленной воды.

Определение обычно ведут с помощью специальных ареометров небольшого размера, которые называются урометрами. Существует два типа урометров: для низкого удельного веса мочи (с делениями от 1,000 до 1,030) и для высокого удельного веса мочи (с делениями от 1,030 до 1,060). Определение начинают с помощью урометра первого типа. Для этого исследуемую мочу наливают по стенке (во избежание образования пены) в цилиндр и осторожно погружают в нее урометр¹. Производят отсчет, беря ту линию на шкале урометра, которая соответствует нижнему мениску.

¹ Если пена все же образуется, ее снимают с помощью фильтровальной бумаги.

Если удельный вес мочи велик, то для исследования берут второй тип урометра. Все определения ведутся обычно при температуре 15° , так как шкала урометров большей частью градуируется на эту температуру. Если моча имеет другую температуру и привести ее к 15° почему-либо трудно, то на каждые 3° выше этой температуры нужно прибавить, а на каждые 3° ниже — убавить по 0,001 от показания шкалы урометра.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦВЕТА МОЧИ

Моча обычно бывает желтого цвета различных оттенков — от бледножелтого до красновато-желтого. Цвет нормальной мочи в основном зависит от содержания в ней уробилина, копропорфирина, уроэритрина и других пигментов. Интенсивность окраски обычно соответствует удельному весу мочи. Исключение составляет диабет, когда моча при высоком удельном весе слабо окрашена, вследствие того, что пигмент разведен большим объемом мочи, удельный вес которой высок из-за содержания сахара. Если моча содержит кровяные пигменты, она бывает окрашена в розоватый или коричневатый цвет; при содержании желчных пигментов — в зеленый или желто-коричневый. Окраска мочи может сильно изменяться при употреблении различных лекарственных и некоторых пищевых веществ. Так, после приема пирамидона моча обычно окрашена в красноватый цвет, после приема александрийского листа — в зеленовато-желтый и т. д.

Характеристику цвета мочи обычно дают в следующих выражениях: соломенножелтый, янтарножелтый, шафранножелтый, розовато-желтый, кроваво-красный, бурокрасный, бурый, зеленовато-бурый и т. п.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЗРАЧНОСТИ МОЧИ

Свежевыпущенная нормальная моча обычно прозрачна; при стоянии в ней появляется небольшая муть в виде облачка, состоящего в основном из эпителиальных клеток, слизи и т. п. Щелочная моча бывает мутной чаще всего от осадка фосфатов кальция и магний-аммония, выпадающих в щелочной среде. При подкислении эта муть исчезает. Моча, богатая мочекислыми солями, при отстаивании образует красноватый осадок, состоящий из кислого мочекислового

натрия. В некоторых патологических случаях моча человека выделяется из мочевого пузыря уже мутной.

Характеристику прозрачности мочи обычно дают в следующих выражениях: прозрачная, мутноватая, мутная и молочномутная.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАПАХА МОЧИ

Запах свежей мочи слабо ароматический, несколько напоминающий запах мясного бульона или свежих яиц. После употребления в пищу хрена или чеснока моча делается зловонной. При наличии большого количества ацетоновых тел моче свойственен «плодовый» запах. Загнившая моча, подвергшаяся щелочному брожению, приобретает неприятный едкий запах аммиака.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕАКЦИИ МОЧИ

Каплю мочи наносят на лакмусовую бумажку. Определяют кислотность мочи. Она может быть кислой, слабокислой, нейтральной, слабо щелочной или щелочной.

Реакция мочи зависит от наличия в ней ряда органических и неорганических кислот и оснований. В значительной мере активная реакция мочи определяется соотношением содержания «кислого» (NaH_2PO_4) и «щелочного» (Na_2HPO_4) фосфатов.

В норме кислотность мочи зависит от пищи. При обычном питании моча человека имеет слабокислую реакцию (рН около 6). Мясная пища сдвигает реакцию мочи в кислую сторону (ацидоз), растительная — в щелочную (алкалоз).

Ацидоз возникает вследствие того, что мясная пища богата фосфатами и серой (в белках). Сера в процессе обмена окисляется до серной кислоты и в результате получается перевес кислотных остатков фосфорной и серной кислот над неорганическими катионами. Растительная пища, наоборот, содержит много неорганических катионов в виде солей органических кислот. Так как последние окисляются в организме до углекислоты и воды, то в моче преобладают основания.

При подагре, диабете, лихорадочных и других заболеваниях реакция мочи может сдвигаться в кислую сторону от присутствия недо-

окисленных кислых органических соединений (продукты распада тканевых белков, ацетоновые тела и т. п.).

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ pH МОЧИ

Наиболее точным методом определения pH является электрометрический метод. Достаточно точно можно определить pH и колориметрически, пользуясь рядом стандартных растворов и специальными приборами. Колориметрическое определение pH основано на том, что разные индикаторы меняют свою окраску при разных pH (табл. IX, стр. 342). pH мочи обычно не выходит за пределы от 4 до 9. С учетом этого обстоятельства определение pH мочи с достаточной точностью для клинических целей можно произвести без стандартных буферных растворов, добавляя к разведенной моче соответствующие индикаторы.

Приборы. 1. Штатив с пробирками.
2. Мерный цилиндр на 100 или 50 мл.
3. Пипетка на 5 мл.

Реактивы. 1. Бромкрезоловый зеленый, 0,1% раствор в спирте.
2. Ализарин красный, 0,1% раствор (в воде).
3. Бромтимоловый синий, 0,1% раствор в спирте.
4. Крезоловый красный, 0,1% раствор в спирте.
5. Фенолфталеин, 0,5% раствор в спирте.

Ход работы

1. В мерный цилиндр наливают 10 мл мочи, добавляют дистиллированной воды до 50 мл и перемешивают содержимое.

2. В 5 пробирок наливают по 5 мл разведенной мочи.

3. Добавляют в пробирки по 6 капель растворов следующих индикаторов: в первую пробирку — бромкрезолового зеленого, во вторую — ализарина красного, в третью — бромтимолового синего, в четвертую — крезолового красного и в пятую — фенолфталеина.

Встряхивают пробирки и по получившейся окраске, пользуясь табл. 7, приблизительно определяют pH мочи.

Таблица 7

Изменение окраски индикаторов в зависимости от pH

Наименование индикатора	Бесцветный	Желтый	Оранжевый	Розовый	Красный	Зеленый	Синий
Бромкрезоловый зеленый	—	До 4,0	—	—	—	4,0—5,6	Выше 5,6
Ализарин красный	—	» 5,0	5,0—6,8	—	Выше 6,8	—	—
Бромтимоловый синий	—	» 6,0	—	—	—	6,0—7,6	Выше 7,6
Крезоловый красный	—	» 7,2	7,2—8,8	—	Выше 8,8	—	—
Фенолфталеин . .	До 8,3	—	—	8,3—10,0	Выше 10,0	—	—

РЕАКЦИЯ НА ХЛОРИДЫ

Человек выделяет с мочой в среднем 8—15 г хлористого натрия в сутки. Это количество колеблется в зависимости от приема поваренной соли с пищей. Лихорадочные заболевания, а также кахексия (например, при раке) вызывают задержку хлоридов в организме.

Хлориды в моче можно легко обнаружить по образованию характерного творожистого осадка хлористого серебра.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. 1. Азотная кислота, 5% раствор.

2. Азотнокислое серебро, 1% раствор.

Ход работы

К 1—2 мл мочи добавляют 0,5—1 мл разведенной азотной кислоты и 8—10 капель раствора азотнокислого серебра. Осадок хлористого серебра указывает на присутствие хлоридов в моче.

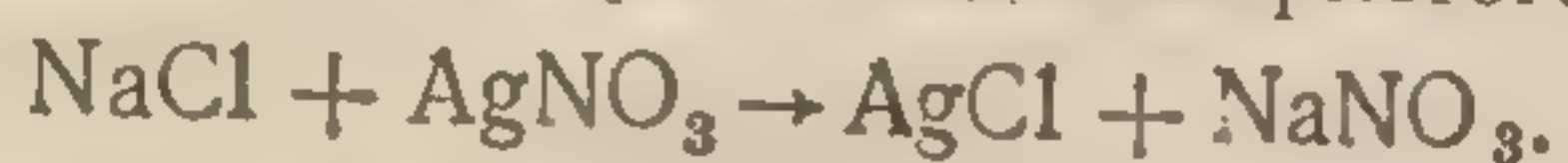
КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРИДОВ В МОЧЕ

Количество хлоридов в моче обычно определяют путем осаждения ионов хлора избытком азотнокислого серебра и обратного титрования роданистым аммонием в присутствии железоаммонийных квасцов в качестве индикатора — метод Фольгардта (см. также определение хлора в крови, стр. 246).

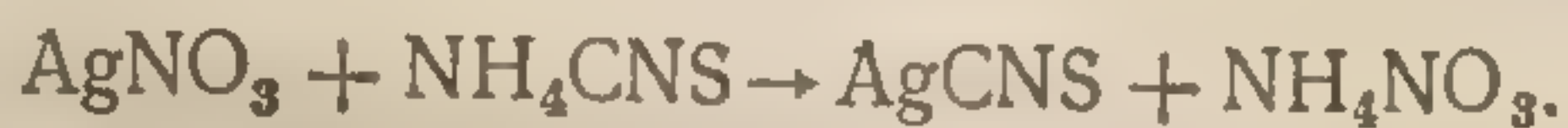
Так как моча обычно имеет слабокислую реакцию, то прямое титрование хлоридов азотнокислым серебром в присутствии хромовокислого калия (метод Мора) дает неточные результаты (вследствие понижения чувствительности индикатора в кислой среде). Прекрасные результаты, однако, дает прямое титрование хлоридов в моче азотнокислой ртутью по методу Воточека с индикатором — нитропруссидом натрия. Не уступая методу Фольгардта в точности, метод Воточека, благодаря прямому титрованию, экономит время определения и заменяет дорогостоящее серебро более дешевой солью ртути.

1. Метод Фольгардта

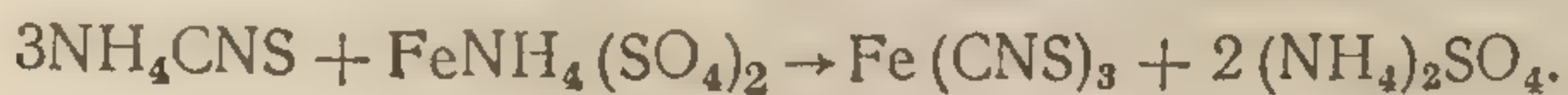
Ионы хлора полностью осаждают титрованным раствором азотнокислого серебра в виде хлористого серебра:



Избыток азотнокислого серебра оттитровывают раствором роданистого аммония при индикаторе — железоаммонийных квасцах:



Когда весь избыток ионов серебра осажден в виде нерастворимого роданистого серебра (AgCNS), ионы родана образуют с железом красное (в разведенных растворах — оранжевое) родановое железо:



Появление оранжевого окрашивания служит, таким образом, признаком конца титрования. Количество хлористого натрия (или ионов хлора) в моче рассчитывают по количеству титрованного раствора азотнокислого серебра, пошедшего на осаждение ионов хлора.

П р и б о р ы. 1. Бюретки, 2 шт.

2. Пипетка на 10 мл.

3. Пипетка на 50 мл.

4. Пипетка на 2 мл.

5. Мерная колба на 100 мл.

6. Коническая колбочка для титрования.

7. Воронка с фильтром.

8. Сухой стакан или колбочка.

- Р е а к т и в ы. 1. Азотнокислое серебро, 0,171 н. раствор (1 мл такого раствора соответствует 0,01 г хлористого натрия) (приготовление см. стр. 321, п. 2).
2. Роданистый аммоний, 0,171 н. раствор (приготовление см. стр. 331, п. 52).
3. Железоаммонийные квасцы, 30% раствор, обесцвеченный азотной кислотой до слабо желтой окраски (8—10 мл концентрированной азотной кислоты на 100 мл раствора).

Х о д р а б о т ы

1. В мерную колбочку отмеривают 10 мл исследуемой мочи и добавляют около 2 мл раствора железоаммонийных квасцов.

2. Из бюретки при помешивании приливают раствор азотнокислого серебра. Достигнув полноты осаждения, прибавляют небольшой избыток раствора. Общее количество титрованного раствора азотнокислого серебра должно быть точно отмерено (обычно 20—25 мл).

3. При помешивании, чтобы предотвратить образование пены, доводят объем жидкости в мерной колбе водой до метки, тщательно перемешивают и отфильтровывают от осадка в сухой стакан (или колбочку) через сухой фильтр.

4. Отмеривают 50 мл фильтрата в колбочку для титрования и оттитровывают избыток азотнокислого серебра раствором роданистого аммония до появления не исчезающего оранжевого окрашивания.

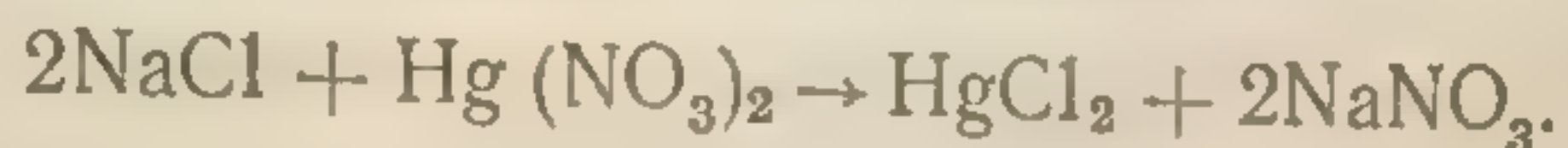
Рассчитывают содержание хлористого натрия в моче в процентах.

Допустим к 10 мл мочи было добавлено 20 мл раствора азотнокислого серебра. На обратное титрование избытка азотнокислого серебра в 50 мл фильтрата (что соответствует 5 мл мочи) пошло 2,4 мл раствора роданистого аммония. На 100 мл фильтрата (10 мл мочи) ушло бы $2,4 \times 2 = 4,8$ мл роданистого аммония. Таким образом, на осаждение хлоридов в 10 мл мочи потребовалось $20,0 - 4,8 = 15,2$ мл титрованного раствора азотнокислого серебра. Поскольку 1 мл этого раствора соответствует 0,01 г хлористого натрия, то 10 мл мочи содержат 0,152 г NaCl. Отсюда процентное содержа-

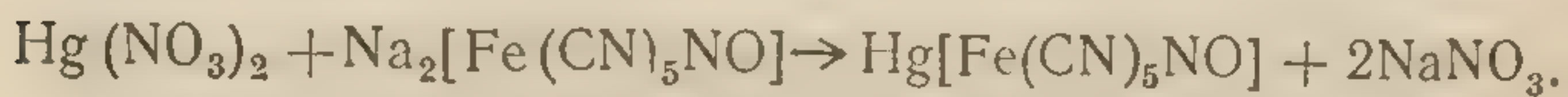
ние хлористого натрия в исследуемой моче составляет 1,52%. Учитывая суточное количество мочи, нетрудно вычислить и выделение хлористого натрия с мочой за сутки.

II. Метод Воточека

Хлориды в моче оттитровывают раствором азотнокислой ртути в присутствии азотной кислоты и нитропруссид натрия. При этом ионы хлора связываются в виде слабо диссоциированной хлорной ртути (сулемы):



Пока ионы ртути связаны в виде хлорной ртути, они не могут реагировать с нитропруссидом. Когда все хлориды перейдут в ртутную соль, свободные ионы ртути образуют осадок нитропруссид ртути, что и является концом титрования:



П р и б о р ы. 1. Воронка с сухим фильтром.

2. Сухая колбочка или стакан.

3. Бюретка.

4. Пипетка на 5 мл.

5. Цилиндр на 50 мл.

6. Цилиндр на 5—10 мл.

7. Коническая колбочка для титрования на 100—150 мл.

Р е а к т и в ы. 1. Ртуть азотнокислая окисная, 0,1н. раствор (приготовление см. стр. 332, п. 53).

2. Нитропруссид натрия, 30% раствор.

3. Азотная кислота, концентрированная.

Х о д р а б о т ы

1. Небольшую порцию исследуемой мочи отфильтровывают через сухой фильтр в сухую колбочку.

2. В колбочку для титрования отмеривают 5 мл отфильтрованной мочи, добавляют 2—3 мл концентрированной азотной кислоты и 3—4 капли раствора нитропруссид натрия.

3. Пробу оттитровывают (титровать лучше на черном фоне) раствором азотнокислой ртути до образования мути, не исчезающей в течение минуты.

Рассчитывают содержание хлористого натрия (или иона хлора) в моче. 1 мл 0,1 н. раствора азотнокислой ртути связывает 0,00355 г хлора, что соответствует 0,00585 г хлористого натрия. Таким образом, если, например, на титрование 5 мл мочи ушло 12,85 мл раствора азотнокислой ртути, то в них содержится: $12,85 \times 0,00585 = 0,075$ г хлористого натрия, или $12,85 \times 0,00355 = 0,045$ г хлора.

Отсюда процентное содержание хлористого натрия в исследуемой моче составляет: $\frac{0,075 \cdot 100}{5} = 1,5\%$, а процентное содержание хлора, соответственно:

$$\frac{0,045 \cdot 100}{5} = 0,9\%.$$

РЕАКЦИЯ НА СУЛЬФАТЫ

В среднем человек выделяет в сутки около 2,5 г сульфатов. Сернокислые соли в моче образуются главным образом за счет окисления серы аминокислот: цистина, цистенна и метионина, поступающих в организм в составе белков пищи. Повышенное выделение сульфатов с мочой обычно бывает связано с ацидозом.

Помимо неорганических сульфатов, часть серной кислоты выделяется с мочой в виде так называемых эфирных кислот, т. е. эфиров серной кислоты с фенолом, крезолом, индоксолом и другими продуктами бактериального разложения аминокислот в кишечнике (стр. 299). Эфирно-серные кислоты образуются в печени и в значительной мере нейтрализуют ядовитое действие продуктов гниения. Некоторая часть серы не окисляется в организме до сульфатов и выделяется с мочой в виде так называемой «нейтральной серы» в составе различных соединений.

Сульфаты в моче можно обнаружить по образованию осадка $BaSO_4$ под действием хлористого бария в присутствии соляной кислоты.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. 1. Соляная кислота, 5% раствор.
2. Хлористый барий, 5% раствор.

Ход работы

К 1—2 мл мочи добавляют 0,5—1 мл разведенной соляной кислоты и 8—10 капель раствора хлористого бария. Образование мелкого кристаллического осадка BaSO_4 указывает на присутствие солей серной кислоты.

РЕАКЦИЯ НА ФОСФАТЫ

Человек выделяет с мочой в сутки около 2,5 г P_2O_5 в виде фосфатов. Фосфаты мочи происходят главным образом из сложных белков (нуклеопротеидов и фосфопротеидов), а также из фосфатидов и некоторых других пищевых веществ, содержащих фосфор. Повышенное выделение фосфатов с мочой обычно имеет место при обильной белковой пище и, так же как и в случае сульфатов, бывает связано с ацидозом.

Фосфаты щелочноземельных металлов выпадают в осадок при подщелачивании мочи и могут быть обнаружены по реакции с молибденово-кислым аммонием. Фосфаты щелочных металлов открывают в фильтрате путем осаждения магниальной смесью.

Приборы. 1. Штатив с пробирками.

2. Пипетка.

3. Воронка с фильтром.

Реактивы. 1. Аммиак, концентрированный раствор.

2. Азотная кислота, 5% раствор.

3. Молибденово-кислый аммоний, раствор в азотной кислоте (приготовление см. стр. 325, п. 20).

4. Магниальная смесь (приготовление см. стр. 325, п. 19).

Ход работы

1. В пробирку наливают 3—5 мл мочи и добавляют 2—3 капли раствора аммиака. Выпадает осадок, состоящий из фосфорнокислого кальция и двойного фосфата магния и аммония. Осадок отфильтровывают и сохраняют фильтрат (см. п. 4).

2. Отфильтрованный осадок промывают один раз водой и растворяют на фильтре в 1—2 мл азотной кислоты, собирая фильтрат в пробирку.

3. К азотнокислomu раствору добавляют около 1 мл раствора молибденово-кислого аммония и нагревают. Выпадает

желтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

4. К 1—2 мл аммиачного фильтрата (п. 1), содержащего фосфаты натрия и калия, добавляют 5—6 капель магнезиальной смеси. Выпадает кристаллический осадок двойной фосфорнокислой соли магния—аммония.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА БЕЛОК В МОЧЕ

Нормальная моча практически не содержит белка. В действительности в ней имеются следы белка, которые не открываются обычными реакциями, применяемыми в клинической лаборатории. В ряде патологических случаев в моче может появиться заметное количество белков, начиная с долей грамма до 25 г в сутки. Такое выделение белка с мочой называется альбуминурией.

Различают почечную (или истинную) альбуминурию и случайную (или ложную) альбуминурию. При истинной альбуминурии белок попадает в мочу в почках. Это указывает чаще всего на заболевание почек или иногда на некоторые формы повышенного кровяного давления. В этих случаях в моче обычно появляются сывороточный альбумин и сывороточный глобулин.

Случайная альбуминурия имеет место при попадании в мочу слизи, крови, гноя и т. п. не из почек.

Цветные реакции мало пригодны для обнаружения белка в моче, так как нормальная и патологическая моча содержит ряд веществ, мешающих этим реакциям.

Для обнаружения в моче белков обычно применяют три реакции на их осаждение: 1) проба кипячением, 2) осаждение крепкой азотной кислотой и 3) осаждение сульфосалициловой кислотой.

Проба кипячением основывается на свертывании белков в присутствии достаточного количества нейтральной соли, при нагревании в слабокислой среде (стр. 28).

Приборы. 1. Штатив с пробирками.

2. Воронка.

3. Пипетки.

Реактивы. 1. Уксусная кислота, 2% раствор.

2. Хлористый натрий, насыщенный раствор.

3. Азотная кислота, концентрированная.
4. Сульфосалициловая кислота, 20% раствор.
5. Моча, содержащая белок.

Х о д р а б о т ы

I. Проба кипячением

1. В пробирку наливают 2—3 мл профильтрованной исследуемой мочи. Если моча щелочная, то ее предварительно подкисляют уксусной кислотой до слабокислой реакции.

2. Добавляют 0,5—1 мл раствора хлористого натрия и нагревают верхнюю часть пробирки.

3. Как только верхний слой жидкости начнет кипеть, прекращают нагревание и добавляют 2—3 капли раствора уксусной кислоты. Появление осадка, не растворяющегося при прибавлении кислоты, указывает на присутствие в исследуемой моче белка.

При кипячении мочи, даже имеющей слабокислую реакцию, может выпасть осадок фосфорнокислых или углекислых солей щелочноземельных металлов. Эти осадки, в отличие от белка, растворимы при добавлении уксусной кислоты.

II. Проба с концентрированной азотной кислотой

В пробирку наливают 1—2 мл концентрированной азотной кислоты и осторожно наслаивают на кислоту 1—2 мл профильтрованной исследуемой мочи. При наличии белка на самой границе двух жидкостей появляется мутный белый слой, называемый обычно кольцом. Если белка в моче мало, то кольцо образуется не сразу, а через 2—4 минуты.

Проба с азотной кислотой более чувствительна, чем проба кипячением, и открывает до 0,0033% белка.

Цветные, но прозрачные кольца на границе могут появиться от изменения мочевых или желчных пигментов под влиянием азотной кислоты. Моча, богатая солями мочевой кислоты, дает кольцо, которое получается не на границе азотной кислоты и мочи, а несколько выше. Моча, богатая мочевиной, может дать осадок, состоящий из плохо растворимой азотнокислой мочевины. Такое кольцо имеет кристаллический вид, кольцо же белка аморфно. Если при повторении реакции мочу предварительно развести водой, то кольца от мочевины не получится. Наконец,

слабо заметная муть может получиться от осаждения муци-
на мочи. Такая муть располагается не на границе моча—азот-
ная кислота, а выше и не так резко ограничена.

III. Проба с сульфосалициловой кислотой

В пробирку наливают 2—3 мл прозрачной слабокислой
или кислой мочи и добавляют 5—6 капель раствора суль-
фосалициловой кислоты. Появление осадка или мути ука-
зывает на присутствие белка.

Проба с сульфосалициловой кислотой очень часто при-
меняется в клинике. Она принадлежит к наиболее чувстви-
тельным реакциям и открывает белок при содержании до
0,0015% его в моче.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА

При исследовании мочи на количественное содержание
в ней белка обычно пользуются методом Стольникова.

Этот метод основан на экспериментально установленном
факте, согласно которому, если при взаимодействии слоя
крепкой азотной кислоты и слоя мочи образование белкового
кольца произойдет между 2-й и 3-й минутами, то в данной
моче содержится приблизительно 0,0033% белка¹.

Приготавливают порции разведенной исследуе-
мой мочи. С каждой порцией проделывают реакцию с азот-
ной кислотой и отмечают разведение, при котором белковое
кольцо получается между второй и третьей минутами.

П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.

2. Воронка.

3. Пипетки.

4. Бюретка.

Р е а к т и в ы. 1. Азотная кислота, концентрированная.

2. Моча, содержащая белок.

Х о д р а б о т ы

1. В 5 пробирок наливают по 2 мл дистиллированной
воды. В первую пробирку приливают 2 мл исследуемой про-
фильтрованной мочи, перемешивают содержимое и 2 мл сме-
си переносят во вторую пробирку и т. д. Из пятой пробирки
2 мл смеси выливают. Таким образом, получается разве-
дение мочи в 2, 4, 8, 16 и 32 раза.

¹ Т. е. 0,033% (pro mille), так как содержание белка в моче
обычно выражают в граммах на 1 000 мл.

2. С содержимым каждой пробирки проделывают реакцию с азотной кислотой. Отмечают разведение мочи в той пробирке, где реакция появления белкового кольца имела место между второй и третьей минутами.

Допустим, что белковое кольцо получилось между первой и второй минутами в пробирке с мочой, разведенной в 8 раз, а между третьей и четвертой минутами — в пробирке с мочой, разведенной в 16 раз. Это значит, что нужное разведение находится где-то между разведением в 8 и 16 раз. Это разведение затем устанавливают, разводя мочу в 10, 12 и т. д. раз и повторяя пробу с азотной кислотой.

Результаты анализа выражают в г р а м м а х б е л к а на 1 000 мл (1 л) мочи (промилле). Для этого найденное разведение мочи умножают на 0,033.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА САХАР В МОЧЕ

В нормальной моче всегда находится глюкоза в незначительных количествах (около 0,02%), которые нельзя обнаружить обычными реакциями, применяемыми при исследовании мочи. После обильного принятия сахара в пищу количество глюкозы в моче может кратковременно увеличиться (пищевая глюкозурия). Длительное выделение глюкозы с мочой говорит о патологической глюкозурии. Последняя может зависеть, с одной стороны, от заболевания почек, а с другой — от диабета.

Качественно глюкозу в моче можно открыть с помощью реакций восстановления металлов (Троммера, с фелинговой жидкостью и Ниландера), получением глюкозаона или пробой на брожение. Реакции Троммера и Ниландера являются наиболее употребительными для открытия глюкозы в моче.

Следует, однако, отметить, что восстанавливать медь в моче может не только сахар, но и другие соединения (мочевая кислота, креатинин, глюкуроновая кислота и др.). Вследствие этого реакции Троммера и с фелинговой жидкостью недостаточно специфичны, в особенности при неточном их проведении. Проба на брожение — вполне доступная и в то же время верная реакция на открытие глюкозы в моче. Эта проба более специфична для глюкозы, так как дает возможность отличить глюкозу не только от восстанавливающих веществ неуглеводной природы, но и от сахаров, неспособных к брожению,

например, от пентоз, которые могут попасть в мочу при соответствующем питании. С фруктозой и некоторыми другими сахарами проба на брожение дает положительную реакцию, но фруктоза и другие сахара (кроме глюкозы) редко встречаются в моче.

Фруктоза и пентозы, кроме того, могут быть обнаружены в моче при помощи специальных реакций (стр. 135).

I. Реакции восстановления металлов

При обнаружении сахара реакциями восстановления металлов (стр. 128) наличие в моче белка мешает реакции, так как он образует комплекс с ионами металлов, а при кипячении может действовать как восстановитель. Вследствие этого в случае обнаружения в моче белка его сначала осаждают кипячением с уксусной кислотой, затем мочу фильтруют и делают реакции на сахар в фильтрате.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. 1. Едкий натр, 10% раствор.
2. Сернокислая медь, 5% раствор.
3. Фелингова жидкость (приготовление см. стр. 333, п. 59).
4. Реактив Ниландера (приготовление см. стр. 331, п. 49).
5. Моча, содержащая глюкозу.

Ход работы

1. Проделывают реакцию Троммера с 1—2 мл исследуемой мочи, беря ее вместо раствора глюкозы (стр. 131).

Производя эту реакцию с мочой, следует учесть, что при продолжительном кипячении медь может быть восстановлена под действием мочевой кислоты и некоторых других соединений. Поэтому нагревают верхнюю часть содержимого пробирки только до закипания. Реакцию на глюкозу считают положительной при появлении желтого осадка гидрата закиси меди или красного осадка закиси меди не позже чем через минуту после прекращения нагревания.

2. С другой порцией мочи аналогичным образом производят реакцию с фелинговой жидкостью (стр. 132).

3. С третьей порцией мочи проделывают реакцию Ниландера (стр. 132).

В отличие от меди висмут не восстанавливается мочевой кислотой; поэтому реакция восстановле-

ний висмута более специфична для обнаружения сахара в моче, чем реакции восстановления меди.

II. Проба на брожение

П р и б о р ы. 1. Бродильные трубки (рис. 12, стр. 149), 3 шт.

2. Ступка с пестиком.

3. Стаканы, 2 шт.

4. Мерный цилиндр.

5. Термостат.

6. Термометр.

Р е а к т и в ы. 1. Едкий натр, 10% раствор.

2. Дрожжи свежие.

3. Глюкоза, 0,5% раствор.

4. Виннокаменная кислота, 1% раствор.

5. Моча, содержащая глюкозу.

Х о д р а б о т ы

1. Кипятят, а потом охлаждают около 100 мл исследуемой мочи. Этим достигают разрушения в моче ферментов и микроорганизмов.

2. Растирают небольшой кусочек дрожжей с 2—3 мл прокипяченной и охлажденной мочи; полученную массу смывают в стакан 30 мл той же прокипяченной и охлажденной мочи и добавляют раствор виннокаменной кислоты до кислой реакции на лакмус (стр. 148).

3. Наливают содержимое стакана в бродильную трубку таким образом, чтобы закрытое колено трубки было полностью заполнено, а в широкой части трубки оставалось некоторое количество жидкости.

4. Заполняют еще две бродильные трубки в качестве контроля: на сбрасывающую силу дрожжей и на содержание сахара в дрожжах. Для этого одну пробу ставят так же, как это указано выше, но вместо мочи берут подкисленный раствор глюкозы, а в другой пробе вместо мочи или раствора глюкозы берут подкисленную виннокаменной кислотой дистиллированную воду.

5. Помещают на 1—3 часа (в зависимости от активности дрожжей) все три заполненные бродильные трубки в термостат при 30—35°.

6. Если в исследуемой моче был сахар и дрожжи удовлетворяли требованиям, то наблюдают появление газа в закры-

том колене бродильной трубки, которая была заполнена мочой. Чтобы убедиться в том, что газ, образовавшийся в трубке с мочой, есть углекислый газ, поступаюг согласно описанию на стр. 150, п. 9.

В двух контрольных трубках при наличии доброкачественных дрожжей наблюдают: в трубке с глюкозой — образование углекислого газа, в трубке с дистиллированной водой — отсутствие образования газа или появление ничтожно-го пузырька газа.

III. Проба с фенилгидразином

Проба на получение оазона очень специфична для обнаружения сахара в моче и находит широкое применение в клиническом анализе. Форма кристаллов глюкозона позволяет отличить их от оазонов, образованных некоторыми другими сахарами (но не фруктозой, так как она дает тот же оазон, что и глюкоза) (стр. 132 и рис. 10).

Получают оазон (стр. 134), беря мочу, содержащую сахар, вместо раствора глюкозы.

IV. Обнаружение фруктозы в моче

Фруктозу обнаруживают в моче при помощи пробы Селиванова (стр. 135).

Фруктоза появляется в моче очень редко и встречается главным образом при обильном попадании этого сахара в пищу в случаях недостаточной функции печени или при диабете.

V. Пробы на пентозы

Пентозы в моче обнаруживают при помощи реакций с орцином и с флороглюцином (стр. 136).

Пентозы могут появиться в моче (пентозурия) при обильном потреблении в пищу растительных продуктов, содержащих эти сахара (например, вишни, сливы). Поскольку пентозы обладают восстанавливающими свойствами, при клиническом анализе мочи бывает важно отличить пентозурию от глюкозурии, что достигается реакциями на пентозы и пробой на брожение (см. выше), так как пентозы не бродят.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРА В МОЧЕ

При глюкозурии в особенности при заболевании диабетом для диагноза и прогноза важно учитывать количество выделяемой глюкозы с мочой. Количество сахара в моче

обычно определяют путем титрования фелинговой жидкостью. Еще чаще пользуются поляриметрическим методом.

1. Титрование сахара в моче фелинговой жидкостью

Содержание сахара в моче можно определить путем титрования фелинговой жидкостью. Благодаря тому что окисная медь находится в фелинговой жидкости в виде комплексного соединения с сегнетовой солью, при кипячении не образуется черного осадка окиси меди, мешающего реакции (стр. 131). Окисная медь, содержащаяся в 1 мл фелинговой жидкости, может быть восстановлена 5 мг глюкозы; поэтому по количеству мочи, восстанавливающей определенное количество фелинговой жидкости, можно определить содержание сахара в моче.

П р и б о р ы. 1. Коническая колбочка для титрования на 100—150 мл.

2. Цилиндр на 100 мл.

3. Пипетка на 10 мл.

4. Бюретка.

5. Стакан химический на 200 мл.

Р е а к т и в ы. 1. Фелингова жидкость (приготовление см. стр. 333, п. 59).

2. Моча, содержащая глюкозу.

Х о д р а б о т ы

1. Исследуемую мочу разводят точно в 5 или в 10 раз. Ополаскивают и заполняют бюретку разведенной мочой.

2. В коническую колбочку отмеривают 10 мл фелинговой жидкости, разбавляют ее 30—40 мл дистиллированной воды и нагревают до кипения.

3. Оттитровывают горячий раствор, продолжая подогревать его, разведенной мочой до исчезновения синей окраски.

При титровании разведенную мочу приливают небольшими порциями, каждый раз снимая колбу с огня и давая отстояться образующемуся оранжевому или красному осадку закиси меди. Если надосадочная жидкость становится едва заметно голубоватой, то добавляют еще 0,1 мл разведенной мочи и, если произошло полное обесцвечивание, берут среднее арифметическое из двух последних отсчетов по шкале бюретки.

По количеству разведенной мочи, пошедшей на титрование, вычисляют содержание в ней сахара. Например, если на титрование 10 мл фелинговой жидкости пошло 6,9 мл мочи, разбавленной в 10 раз, что соответствует 0,69 мл неразведенной мочи, то, учитывая что 1 мл фелинговой жидкости восстанавливается 5 мг сахара, 0,69 мл мочи содержит $10 \times 5 = 50$ мг = 0,05 г сахара, откуда процентное содержание сахара в моче:

$$x = \frac{0,05 \cdot 100}{0,69} = 7,25.$$

II. Определение содержания сахара в моче поляриметрическим методом

Поляриметрический метод основан на свойстве глюкозы вращать плоскость поляризации света. Для исследования мочи имеются очень удобные специальные поляриметры (сахариметры), которые

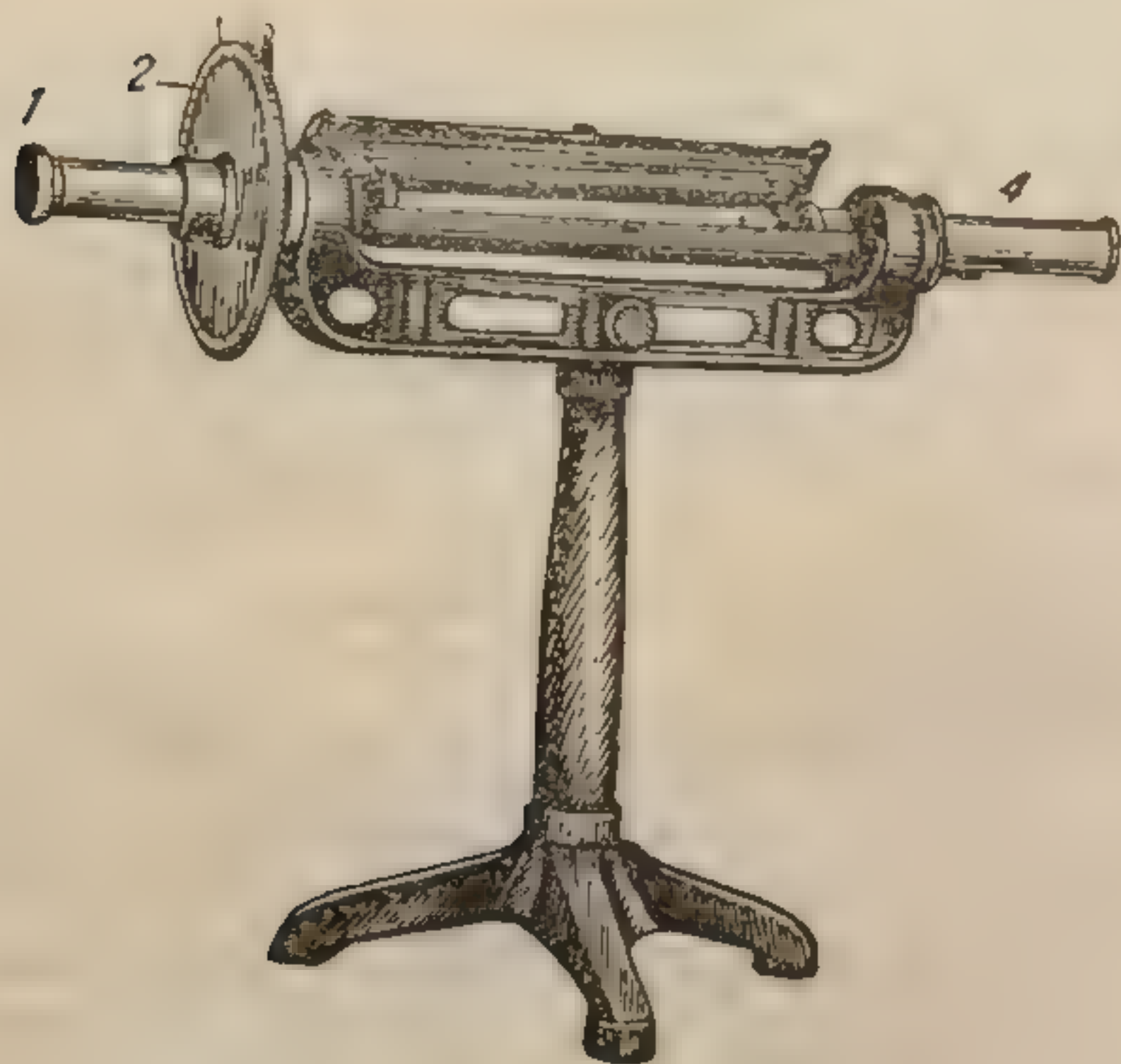


Рис. 36. Поляриметр (сахариметр).



Рис. 37.
Трубка поляриметра.

с удовлетворительной точностью прямо показывают процентное содержание глюкозы в моче. Поляриметр простого устройства изображен на рис. 36. Поляриметр снабжен специальными трубками (рис. 37). При определении глюкозы для удобства расчета обычно пользуются трубками длиной 1,894 и 0,947 дм. Источником света служит горелка с хло-

ристым натрием или натриевая лампа, дающие монохроматический свет натриевого пламени.

Свет поляризуется в поляризаторе (4) (рис. 36), проходит через трубку, заполненную исследуемой мочой, и поступает в анализатор, укрепленный на диске 2. Наблюдение производится через окуляр 1. Поле зрения представляется в виде круга, разделенного на две половины.

Перед исследованием прежде всего устанавливают нулевую точку прибора. Для этого вкладывают в прибор трубку, наполненную дистиллированной водой; устанавливают окуляр 1 так, чтобы линия, разделяющая поле зрения пополам, была видна отчетливо, и далее, вращая диск 2, добиваются положения, при котором обе половины поля зрения освещаются одинаково, что и будет нулевой точкой прибора. Если нулевая точка прибора не совпадает с нулем диска, то отмечают полученную разницу.

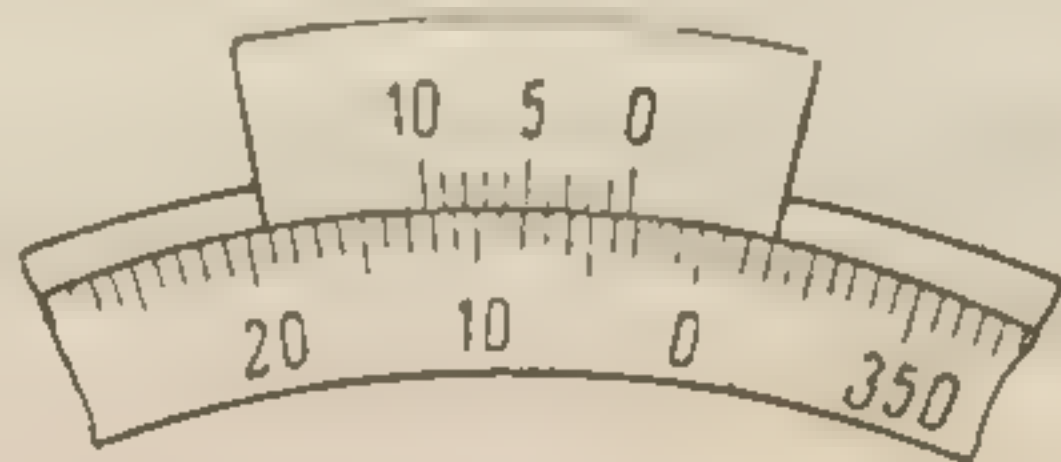


Рис. 38. Нониус.

Отсчет показаний диска как при установке нулевой точки, так и при измерении угла вращения производится с помощью нониуса 3, который показывает десятые доли градуса. На рис. 38 диск смещен вправо. Нуль неподвижно закрепленного нониуса находится между 3-м и 4-м делениями, и, таким образом, угол вращения составляет $+3^\circ$ с долями. Число десятых долей соответствует тому делению нониуса, которое совпадает с делением диска. На приведенном рисунке — это 4-е деление нониуса. Таким образом отсчитывают $+3,4^\circ$.

Если нулевая точка прибора лежит слева от нуля, то полученную разницу при исследовании мочи (и вообще растворов глюкозы и других правовращающих соединений) прибавляют к найденному числу градусов. Когда же нулевая точка прибора сдвинута вправо, то полученную разницу вычитают. Если, установив диск на нулевую точку, далее наполнить трубку раствором оптически активного вещества (например, глюкозы), то обе половины поля зрения прибора станут уже освещенными неодинаково и для восстановления равномерности освещения необходимо будет повернуть диск на определенный угол. При исследовании растворов глюкозы (и вообще правовращаю-

щих веществ) одинаковое освещение обеих половин поля зрения достигается вращением диска по ходу часовой стрелки. Когда такое положение будет найдено, производят по шкале отсчет угла вращения в градусах.

Если для анализа взята трубка длиной в 1,894 дм, то процентное содержание сахара численно равно величине угла вращения в градусах. Если взята трубка длиной 0,947 дм, то число градусов нужно умножить на два. Такая легкость вычисления объясняется тем обстоятельством, что содержание сахара вычисляют по формуле:

$$A = \frac{100 \alpha}{l \cdot 52,8},$$

где A — процентное содержание сахара. α — угол вращения в градусах, l — длина трубки в дециметрах, 52,8 — удельное вращение глюкозы.

Если длина трубки равна 1,894 дм, то формула примет вид:

$$A = \frac{100 \cdot \alpha}{1,894 \cdot 52,8} = \frac{100 \cdot \alpha}{100} = \alpha,$$

т. е. процентное содержание глюкозы в растворе численно равно углу вращения в градусах.

Так как окраска мочи мешает определению, то мочу предварительно обесцвечивают при помощи уксуснокислого свинца, который адсорбирует красящие вещества мочи. Мочу (в особенности если она щелочная) слегка подкисляют, так как иначе свинец может выпасть в осадок и частично осадить также и сахар.

П р и б о р ы. 1. Поляриметр (сахариметр).

2. Стаканы, 2 шт.

3. Воронка с фильтром.

4. Мерные цилиндры.

Р е а к т и в ы. 1. Уксусная кислота, концентрированная.

2. Уксуснокислый свинец, 10% раствор.

3. Лакмусовая бумажка.

4. Моча, содержащая глюкозу.

Х о д р а б о т ы

1. Определяют реакцию мочи лакмусовой бумажкой. Если моча щелочная, ее подкисляют несколькими каплями уксусной кислоты до кислой реакции на лакмус.

2. Измеряют объем мочи. Добавляют к ней раствор уксуснокислого свинца в количестве 0,1 объема мочи и фильтруют (для обесцвечивания).

Наполняют трубку (длиной в 1,894 дм) полученным фильтратом и определяют угол вращения. Полученную цифру умножают на 1,1 (учитывая разведение мочи уксуснокислым свинцом) и получают процент глюкозы в моче.

Если для исследования пользуются трубкой длиной не 1,894 дм, а 0,947 дм, то полученный результат умножают на 2. Если исследуемая моча содержит белок, то последний предварительно удаляют кипячением и фильтрованием мочи, так как растворы белка вращают влево¹.

РЕАКЦИИ НА АЦЕТОНОВЫЕ ТЕЛА В МОЧЕ

Ацетоновые тела: β -оксимасляная кислота, ацетоуксусная кислота и ацетон появляются в моче при нарушениях жирового или углеводного обмена, в частности, при диабете, а также при голодании и неправильном режиме питания.

Обнаружение ацетоновых тел в моче при клиническом исследовании имеет большое диагностическое значение, так как дает возможность установить нарушение обмена веществ и неправильный пищевой режим.

При диабете такого рода исследования мочи особенно важны не только для диагностики заболевания, но и для контроля эффективности лечения.

Нормальная моча содержит незначительные количества ацетоновых тел, которые не выявляются обычными реакциями. При повышенном содержании ацетоновых тел в моче их открывают реакциями, описанными на стр. 111.

При исследовании мочи необходимо учитывать, что проба с хлорным железом на ацетоуксусную кислоту малочув-

¹ В ряде случаев в моче возможно присутствие и других левовращающих соединений, например, молочного сахара, пентозы, β -оксимасляной кислоты и др. Это обстоятельство может обуславливать ряд ошибок при количественном определении глюкозы в моче с помощью поляриметра. Чтобы избежать этих ошибок, мочу исследуют в поляризационном аппарате как непосредственно, так и после брожения и обработки уксуснокислым свинцом. В результате брожения глюкоза разрушается, а левовращающие вещества остаются (за исключением редко встречающейся в моче фруктозы, которая тоже бродит). Найденные в обоих случаях величины складывают.

ствительна, и отрицательные результаты пробы лишь означают, что в исследуемой моче ацетоуксусной кислоты меньше 0,05%. С другой стороны, такое же окрашивание может получиться при приеме некоторых лекарственных веществ; в особенности салициловых препаратов, аспирина, салол и др. При положительной реакции с хлорным железом необходимо поэтому поставить проверочную пробу. Для этого мочу кипятят 2 минуты, охлаждают, фильтруют и далее ставят соответствующую реакцию. Так как ацетоуксусная кислота при кипячении разрушается, то после кипячения реакция не должна получаться или должна быть значительно слабее.

Обнаружение малых количеств ацетона в моче

Более чувствительным способом обнаружения ацетоновых тел в моче является отгонка ацетона из небольшой

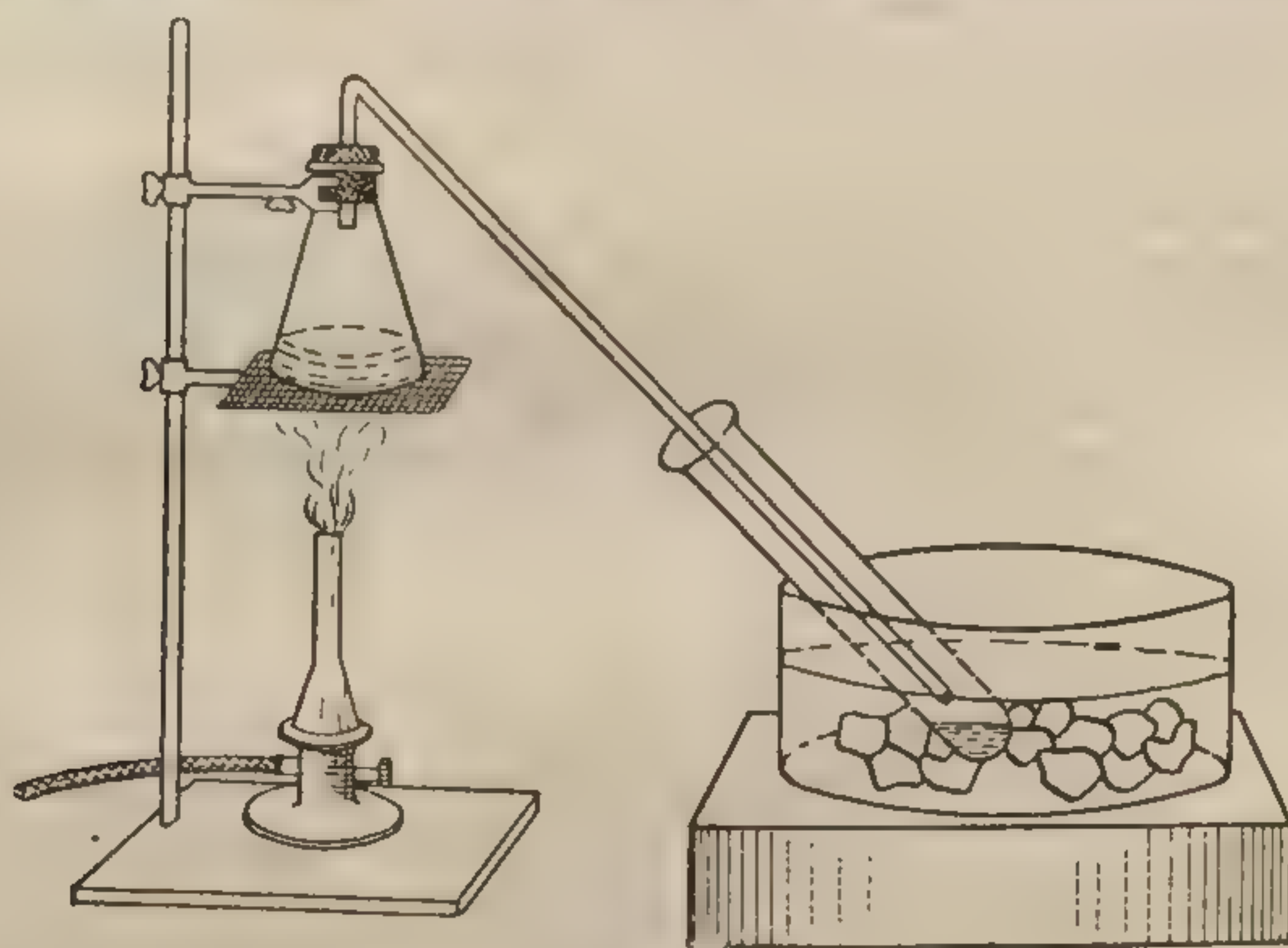
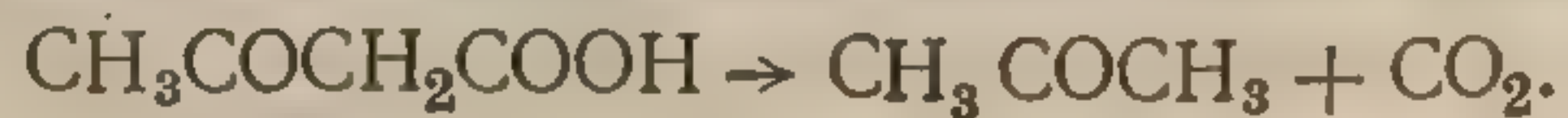


Рис. 39. Прибор для отгонки ацетона.

порции мочи и открытие ацетона в отгоне. В этом случае ацетоуксусная кислота разрушается, давая ацетон:



Ацетон отгоняется с первыми порциями дистиллата. Концентрация ацетона в отгоне, таким образом, значительно выше, чем в моче. Кроме того, при наличии в моче спирта, который также образует иодоформ под действием иода (стр. 149), в отгон попадает лишь ничтож-

ное количество спирта и проба на ацетон становится более специфичной.

П р и б о р ы. 1. Прибор для отгонки ацетона (рис. 39).
2. Кусочки прокаленного фарфора.

Р е а к т и в ы. 1. Моча, содержащая малые количества (0,01 — 0,05%) ацетона.
2. Каприловый (октиловый) спирт.
3. Едкий натр, 10% раствор.
4. Раствор иода в иодистом калии (приготовление см. стр. 329, п. 39).
5. Нитропруссид натрия, 10% раствор, свежеприготовленный.
6. Уксусная кислота, концентрированная.
7. Аммиак, концентрированный раствор.

Х о д р а б о т ы

1. В колбочку прибора для отгонки ацетона (рис. 39) наливают 8 — 10 мл исследуемой мочи и помещают туда же 2 — 3 кусочка прокаленного фарфора.

2. Закрывают колбочку пробкой с отводной трубкой, которая погружена в пробирку, находящуюся в бане с водой и льдом (или снегом). Осторожно нагревают колбочку на слабом огне, кипятят мочу и собирают первые 1 — 2 мл отгона.

Если моча при кипячении пенится, то добавляют к ней каплю октилового спирта. В этом случае отгон может быть мутным, что не мешает дальнейшему ходу работы.

3. С полученным отгоном делают реакции на образование иодоформа и с нитропруссидом (стр. 113).

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА КРОВЯНЫЕ ПИГМЕНТЫ В МОЧЕ

Различают появление в моче собственно крови (гематурия) и кровяных пигментов (гемоглобинурия). Кровь в моче появляется при заболеваниях почек и при повреждении мочевыводящих путей. Гемоглобинурия может иметь место при ряде заболеваний, связанных с гемолизом. В обоих случаях кровяные пигменты открывают химическими реакциями. При гематурии, в отличие от гемоглобинурии, микроскопическим исследованием обнаруживают эритроциты.

Кровяные пигменты в моче открывают кипячением со щелочью. При этом выпадает осадок фосфатов, захватывающий гемохромоген, образующийся из кровяного пигмента. Отстоявшийся осадок бывает буроватого цвета.

Помимо этого, применяют также гваяковую и бензидиновую пробы (стр. 235 и 236).

П р и б о р ы. Штатив с пробирками.

Р е а к т и в ы. 1. Едкий натр, 10% раствор.

2. Гваяковая смола, свежеприготовленный раствор (приготовление см. стр. 322, п. 10).

3. Перекись водорода, 3% раствор.

4. Уксусная кислота, 2% раствор.

5. Бензидин, 5% раствор в ледяной уксусной кислоте, свежеприготовленный.

6. Моча, содержащая кровь.

Х о д р а б о т ы

I. Кипячение со щелочью

Наливают в пробирку 4 — 5 мл нефилътрированной исследуемой мочи, добавляют 5 — 6 капель раствора щелочи и кипятят.

Наблюдают образование хлопьевидного осадка фосфатов. В присутствии кровяного пигмента отстоявшийся осадок темнее мочи; в отсутствии кровяного пигмента осадок фосфатов будет более светлым, чем моча¹.

II. Гваяковая проба

1. Наливают в пробирку 4 — 5 мл свежевypущенной нефилътрированной исследуемой мочи и определяют ее реакцию лакмусовой бумажкой.

¹ В ряде случаев может оказаться, что моча содержит мало фосфатов, и получается очень слабый осадок. Тогда фосфаты следует прибавить искусственно. Для этого мочу смешивают с несколькими каплями раствора хлористого кальция, приливают раствор едкого натра и несколько капель фосфата натрия. Последний дает с хлористым кальцием осадок фосфата кальция. Затем производят кипячение мочи.

В случае наличия интенсивного окрашивания мочи, что может мешать различить цвет осадка, этот осадок отфильтровывают и промывают водой, что дает возможность определить цвет осадка.

Если моча щелочная, то ее нужно подкислить.

2. Содержимое пробирки кипятят. Кипячение производят потому, что при наличии в моче гноя он обычно тоже дает положительную реакцию, так как содержит пероксидазу. После кипячения мочи пероксидаза гноя, так же как и другие ферменты, разрушается и гной уже не дает положительной реакции.

В пробирку приливают 1 — 2 мл раствора гваяковой смолы и несколько капель перекиси водорода.

Появление синего окрашивания указывает на образование озонида гваяковой смоляной кислоты, вследствие переноса на смоляную кислоту кислорода перекиси водорода с помощью кровяного пигмента (стр. 66).

III. Бензидиновая проба

1. Наливают в пробирку 1 — 2 мл свежевыпущенной нефилтрованной мочи; кипятят и потом охлаждают.

2. Добавляют равный объем раствора бензидина и несколько капель перекиси водорода. При положительной реакции наблюдают появление синего или зеленого окрашивания продуктов окисления бензидина с помощью кровяного пигмента за счет кислорода перекиси водорода (стр. 236). При продолжительном стоянии мочи гемоглобин переходит в метгемоглобин и обнаружить кровь бензидиновой реакцией не удастся.

РЕАКЦИИ НА ЖЕЛЧНЫЕ ПИГМЕНТЫ В МОЧЕ

Желчные пигменты — билирубин, биливердин и др. — появляются в моче обычно в виде щелочных солей при желтухе.

Моча, содержащая желчные пигменты, имеет желтовато-коричневое или зеленое окрашивание. Кроме того, при взбалтывании пена желтушной мочи бывает окрашена в желтый цвет.

Химически присутствие желчных пигментов в моче открывают реакциями, описанными на стр. 251. При пробе Гмелина доказательным для наличия желчных пигментов в моче является получение зеленого кольца. При стоянии происходит дальнейшее окисление пигментов и все кольца окрашиваются в желтый цвет.

РЕАКЦИЯ НА ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ В МОЧЕ

Желчные кислоты в виде их солей иногда встречаются в моче при желтухе.

Присутствие в моче желчных кислот может быть обнаружено качественно и отчасти количественно с помощью пробы на понижение поверхностного натяжения (стр. 256).

П р и б о р ы. Стакан.

Р е а к т и в ы. 1. Едкий натр, 1% раствор.
2. Фенолфталеин, 0,1% раствор в спирте.
3. Серный цвет.

Х о д р а б о т ы

1. Наливают в стакан около 50 мл мочи и прибавляют к ней 1 — 2 капли фенолфталеина.

2. Нейтрализуют мочу раствором едкого натра до появления розового окрашивания от фенолфталеина и помещают минут на 10 в холодную воду.

3. Насыпают на поверхность мочи немного серного цвета. Если серный цвет сразу опускается на дно, то желчных кислот и их солей в моче около 0,01%. Если для опускания серного цвета требуется слабое взбалтывание мочи, то желчных кислот и их солей в моче около 0,0025%. Если после взбалтывания сера остается на поверхности, то моча желчных кислот и их солей не содержит.

РЕАКЦИИ НА УРОБИЛИН И УРОБИЛИНОГЕН

Желчный пигмент б и л и р у б и н подвергается в кишечнике восстановлению под действием бактерий. Главная масса продуктов восстановления выделяется с калом в виде пигмента с т е р к о б и л и н а. Однако часть его (у р о б и л и н)¹ всасывается в кровь воротной вены и восстанавливается далее до бесцветного у р о б и л и н о г е н а, который частично выделяется с мочой.

Свежевыпущенная нормальная моча поэтому содержит уробилиноген, но не уробилин. Однако при стоянии на свету, под действием кислорода воздуха, в суточном коли-

¹ «Уробилин» мочи и «стеркобилин» кала имеют одинаковый состав и представляют собой смесь двух пигментов: мезобилина и тетрагидромезобилина.

честве мочи из уробилиногена образуется около 0,03 г уробилина.

Нахождение больших количеств уробилина или уробилиногена в моче является важным указанием на недостаточность функции печени. Моча может содержать много уробилина также при заболеваниях, связанных с повышенным распадом эритроцитов.

При нарушениях функции печени, а также при инфекционных и некоторых других болезнях количество уробилина (уробилиногена) в моче может достигать до 2 г в сутки.

Раствор уробилина дает характерный спектр поглощения (рис. 33, 7). В определенных условиях уробилин обладает способностью красиво флуоресцировать, чем и пользуются для его обнаружения.

I. Проба Ненцкого на уробилин

П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.
2. Каучуковая пробка.

Р е а к т и в ы. 1. Соляная кислота, 2% раствор.
2. Амиловый спирт.
3. Раствор хлористого цинка в спирте (приготовление см. стр. 330, п. 44).

Х о д р а б о т ы

1. Наливают в пробирку 8 — 10 мл исследуемой мочи и слегка подкисляют ее соляной кислотой. При этом уробилин переходит в свободную кислоту, которая нерастворима в воде.

2. Добавляют 2 — 3 мл амилового спирта и, закрыв пробирку каучуковой пробкой, перемешивают содержимое многократным перевертыванием пробирки. Уробилин растворяется в амиловом спирте.

3. Дают жидкости отстояться и к верхнему алкогольному слою (не сливая его), содержащему растворенный уробилин, прибавляют несколько капель раствора хлористого цинка. При наличии в моче уробилина получается зеленая флуоресценция.

II. Спектроскопическая проба на уробилин

П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.
2. Воронка.
3. Спектроскоп.

Р е а к т и в ы. 1. Аммиак, 10% раствор.
2. Хлористый цинк, 1% раствор.

Ход работы

1. Наливают в пробирку 8 — 10 мл исследуемой мочи и добавляют несколько капель гидроокиси аммония до заметного запаха аммиака. Уробилин при этом образует аммонийную соль, растворимую в воде.

2. Дают отстояться несколько минут и отфильтровывают осадок фосфатов.

3. К фильтрату добавляют несколько капель хлористого цинка. Наблюдают зеленую флуоресценцию раствора.

4. Рассматривают жидкость в спектроскоп и наблюдают полосу поглощения в сине-зеленой части спектра (рис. 33, 7).

III. Проба на уробилиноген

П р и б о р ы. 1 Штатив с пробирками.

2. Пипетка на 10 мл с делениями

Р е а к т и в ы. Раствор парадиметиламинобензальдегида (приготовление см. стр. 330, п. 41).

Ход работы

1. Свежевыпущенную мочу разводят в 10, 20 и 40 раз. Для этого в пробирку отмеривают 1 мл мочи, добавляют к нему 9 мл воды и перемешивают. В другую пробирку переносят пипеткой 5 мл мочи, разведенной в 10 раз, и добавляют 5 мл воды; перемешивают и получают мочу, разведенную в 20 раз. В третью пробирку отмеривают 5 мл мочи из второй пробирки и добавляют 5 мл воды — получают мочу, разведенную в 40 раз.

2. В четыре пробирки наливают: в первую — 1 мл неразведенной мочи; во вторую — 1 мл мочи, разведенной в 10 раз; в третью — 1 мл мочи, разведенной в 20 раз; в четвертую — 1 мл мочи, разведенной в 40 раз.

3. Во все 4 пробирки прибавляют по 10 капель раствора парадиметиламинобензальдегида, слегка встряхивают и рассматривают их на белом фоне.

Розовая окраска, развивающаяся в течение 3—4 минут, указывает на присутствие уробилиногена.

Положительная реакция при разведении мочи до 1 : 20 считается нормальной. Обнаружение уробилиногена при более высоком разведении мочи указывает на недостаточность функции печени.

В
бактер
кисли
кисло
После
врежи
крезол
в так
но й
в этом
И н
и н д о
мально
количе
Мно
ных, м
в киш
бактер
Кач
основ
На
слотой,
гидроли



Индокси

Дале
капель
ксил ок



И н

РЕАКЦИЯ НА ИНДИКАН

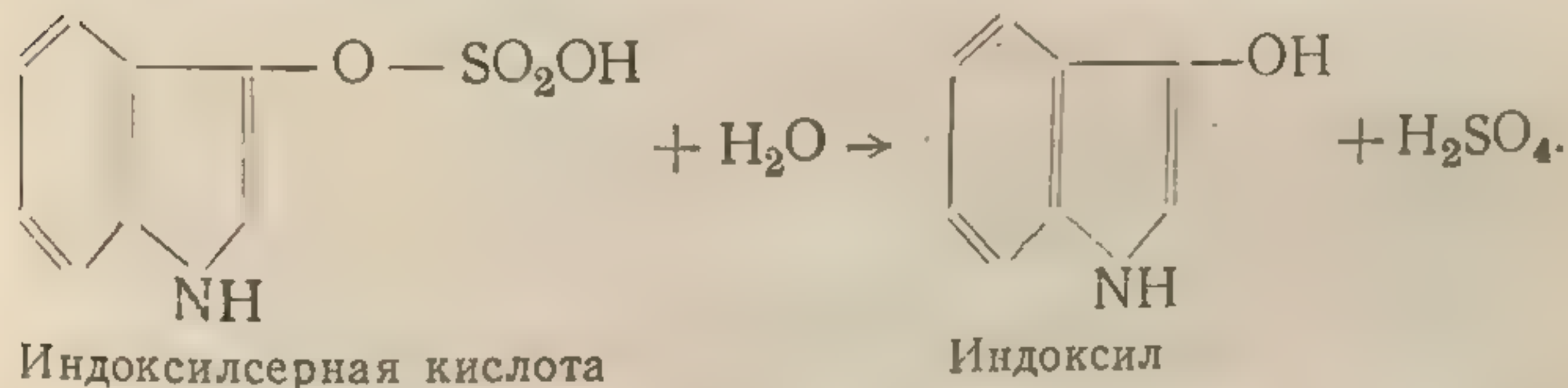
В кишечнике под влиянием всегда содержащихся там бактерий имеет место частичное разложение (декарбоксилирование, дезаминирование и окисление) ряда аминокислот с образованием продуктов, ядовитых для организма. Последние всасываются в кровь и в значительной мере обезвреживаются печенью. Ароматические соединения — фенол, крезол, а также индоксил, скатоксил — при этом вступают в так называемые «парные» соединения с серной или глюкуроновой кислотой и в этом виде выделяются с мочой.

Индикан — это калиевая или натриевая соль индоксилсерной кислоты. Индикан в нормальной моче человека содержится в очень небольших количествах (за сутки выделяется около 0,01 г).

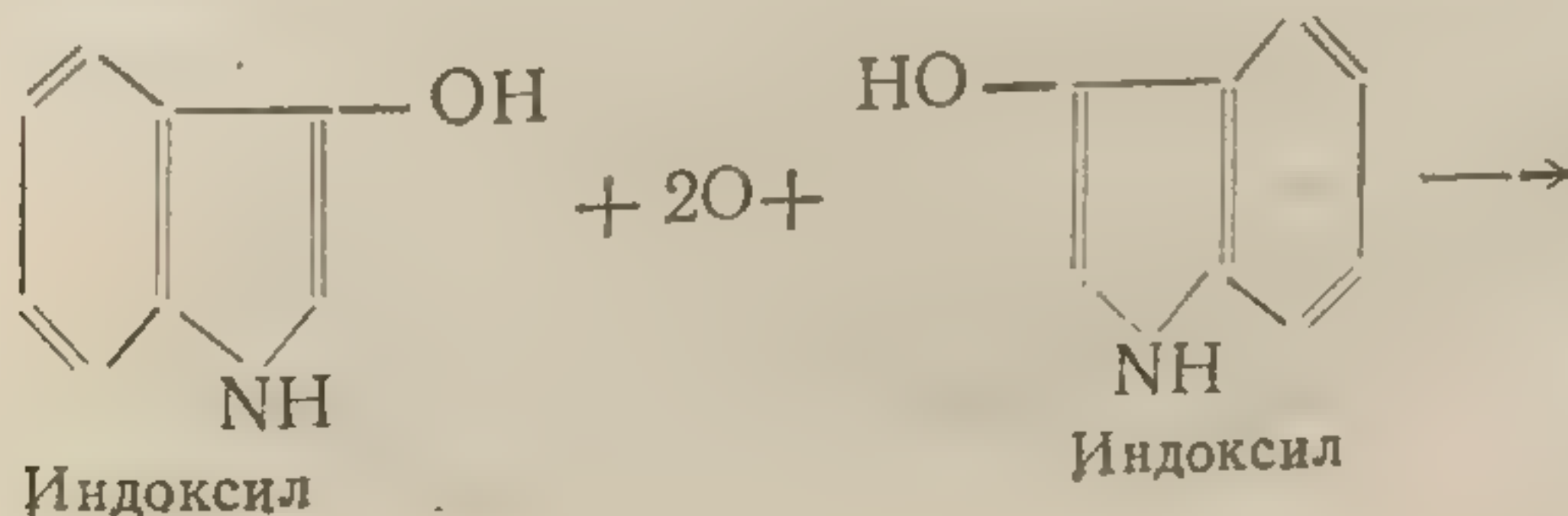
Много индикана содержится в моче травоядных животных, много его и в моче человека при усиленном гниении в кишечнике (наличие большого количества гнилостных бактерий).

Качественная реакция на открытие в моче индикана основывается на следующем:

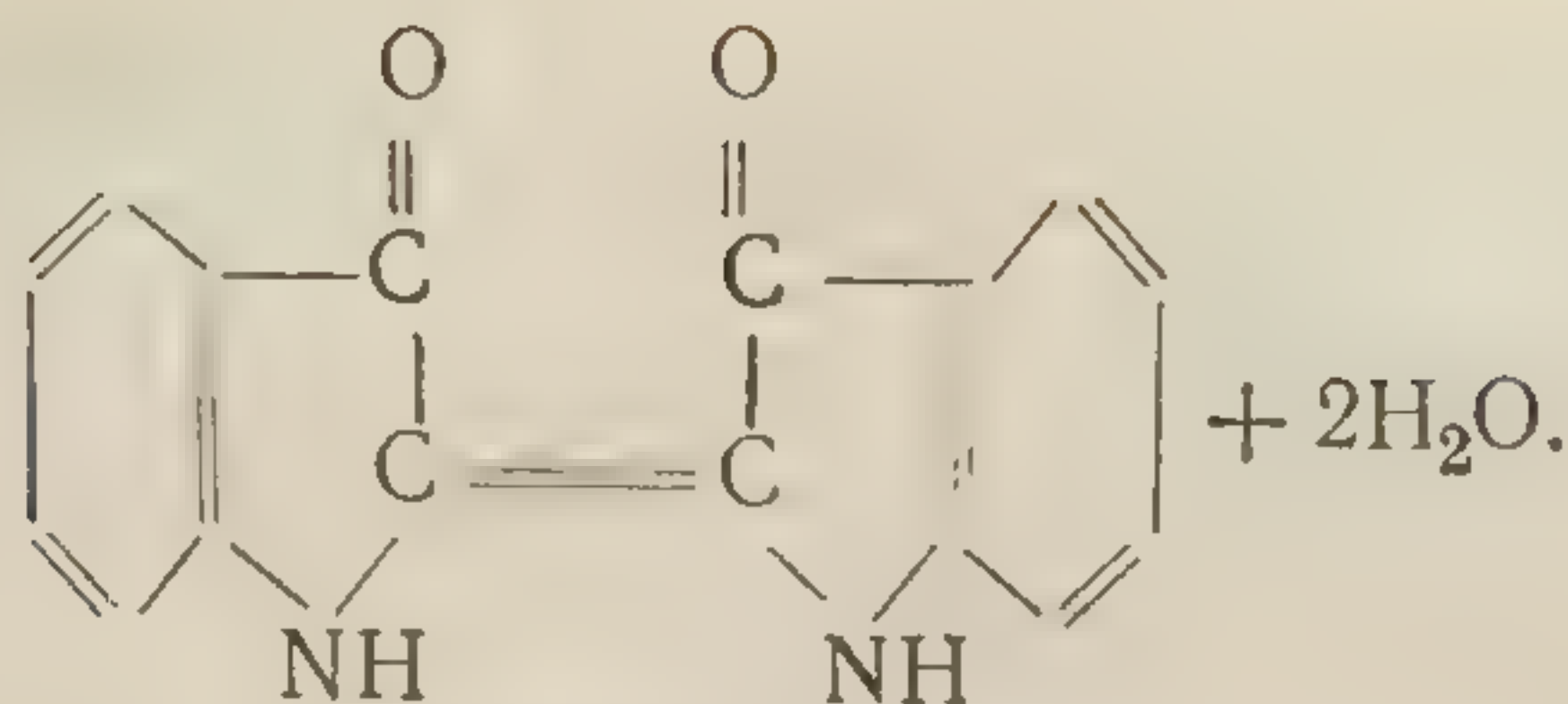
На исследуемую мочу действуют крепкой соляной кислотой, индоксилсерная кислота подвергается при этом гидролизу по уравнению:



Далее добавляют немного хлороформа и несколько капель марганцовокислого калия, в результате чего индоксил окисляется в синее индиго по схеме:



—→



Синее индиго

Полученное синее индиго, благодаря хорошей растворимости в хлороформе, окрашивает последний в синий цвет. Интенсивность полученной окраски служит до некоторой степени показателем количества индикана в исследуемой моче.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. 1. Соляная кислота, концентрированная.

2. Хлороформ.

3. Марганцовокислый калий, 1% раствор.

Ход работы

1. В пробирку наливают 4 — 5 мл исследуемой мочи и прибавляют при перемешивании равный объем крепкой соляной кислоты.

2. Добавляют около 1 мл хлороформа и 1 — 2 капли раствора марганцовокислого калия, закрывают пробирку пробкой и несколько раз перевертывают, не встряхивая.

Ставят пробирку в штатив и наблюдают окрашивание хлороформного слоя в синий цвет.

По интенсивности этой окраски можно приблизительно судить и о количестве индикана в моче. Результаты выражают обычно так: «в норме»; «резко выражен».

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОЧИ

Описанные выше реакции на различные вещества в моче применяются при клиническом анализе мочи.

Кроме того, при клиническом анализе обычно производят микроскопическое исследование осадка мочи. Различают неорганизованные осадки (химические вещества — см. ниже) и организованные осадки (различные клетки, бактерии и т. п.).

АНАЛИЗ МОЧИ

Гр.
Удельный вес ... *1,018*
Цвет ... *соломенно-желтый*
Прозрачность ... *прозрачная*
Реакция ... *кислая*
Белок ... *0,033%*
Сахар ... *не открывается*
Ацетон ... *нет*
Ацето-уксусная кислота ... *нет*
Кровяной пигмент ... *нет*
Желчные пигменты ... *слабо*
Уробилин ... *слабо*
Индикан ... *в норме*
Осадок ... *незначительный*
Эритроциты в осадке ... *1-3 в поле зрения*
Лейкоциты в осадке ... *3-5 в поле зрения*
.....

Анализ производил (подпись)

Рис. 40. Клинический анализ мочи.

Эритроциты под микроскопом имеют вид желтых дисков; при рассмотрении сбоку — вид бисквитов. В кислой концентрированной моче края эритроцитов неровные, зазубренные; в щелочной моче, наоборот, они разбухают и становятся резко очерченными. Иногда эритроциты совсем теряют пигмент в результате гемолиза, и остаются так называемые «тени эритроцитов». Так как гемолиз чаще имеет место в почечных канальцах, где моча менее концентрирована, то в большинстве случаев это является признаком почечного происхождения крови.

Незначительное количество эритроцитов нередко можно обнаружить в совершенно нормальной моче. При наличии в исследуемой моче менее 10 — 15 эритроцитов в поле зрения бензидиновая реакция на кровь отрицательна.

Лейкоциты по размеру больше эритроцитов. В моче они встречаются в виде зернистых шариков, чаще правильной формы. Под микроскопом лейкоциты по внешнему виду похожи на некоторые эпителиальные клетки. Отличают их друг от друга по реакции с иодом. Последний окрашивает лейкоциты в бурый цвет (гликоген), а эпителиальные клетки — в желтоватый.

Небольшое количество лейкоцитов встречается в нормальной моче. Большое их количество в моче указывает на патологическое состояние почек или мочевых путей.

* * *

К л и н и ч е с к и й а н а л и з м о ч и производится почти при каждом заболевании и играет важную диагностическую и прогностическую роль.

Приводим в качестве примера обычный (сокращенный) клинический анализ мочи больного (рис. 40).

* АНАЛИЗ МОЧЕВЫХ ОСАДКОВ И СРОСТКОВ

Для анализа часто доставляется моча, содержащая муть и даже осадки. Анализ осадков представляет интерес, так как нередко они появляются в результате нарушения обмена веществ.

Осадки мочи делят на организованные и неорганизованные.

К организованным осадкам относят микроорганизмы, кровяные клетки, частицы эпителия мочевыводящих и половых путей и т. п.

Неорганизованными называют осадки различных солей и других веществ. Вследствие неодинаковой растворимости этих веществ в кислой и щелочной среде осадки кислой и щелочной мочи различны.

В кислой моче могут встречаться осадки мочевой кислоты (рис. 27, стр. 214) или кислых калиевых или натриевых солей мочевой кислоты (биуратов), а также щавелевокислого кальция (рис. 41) и двузамещенного фосфорнокислого кальция.

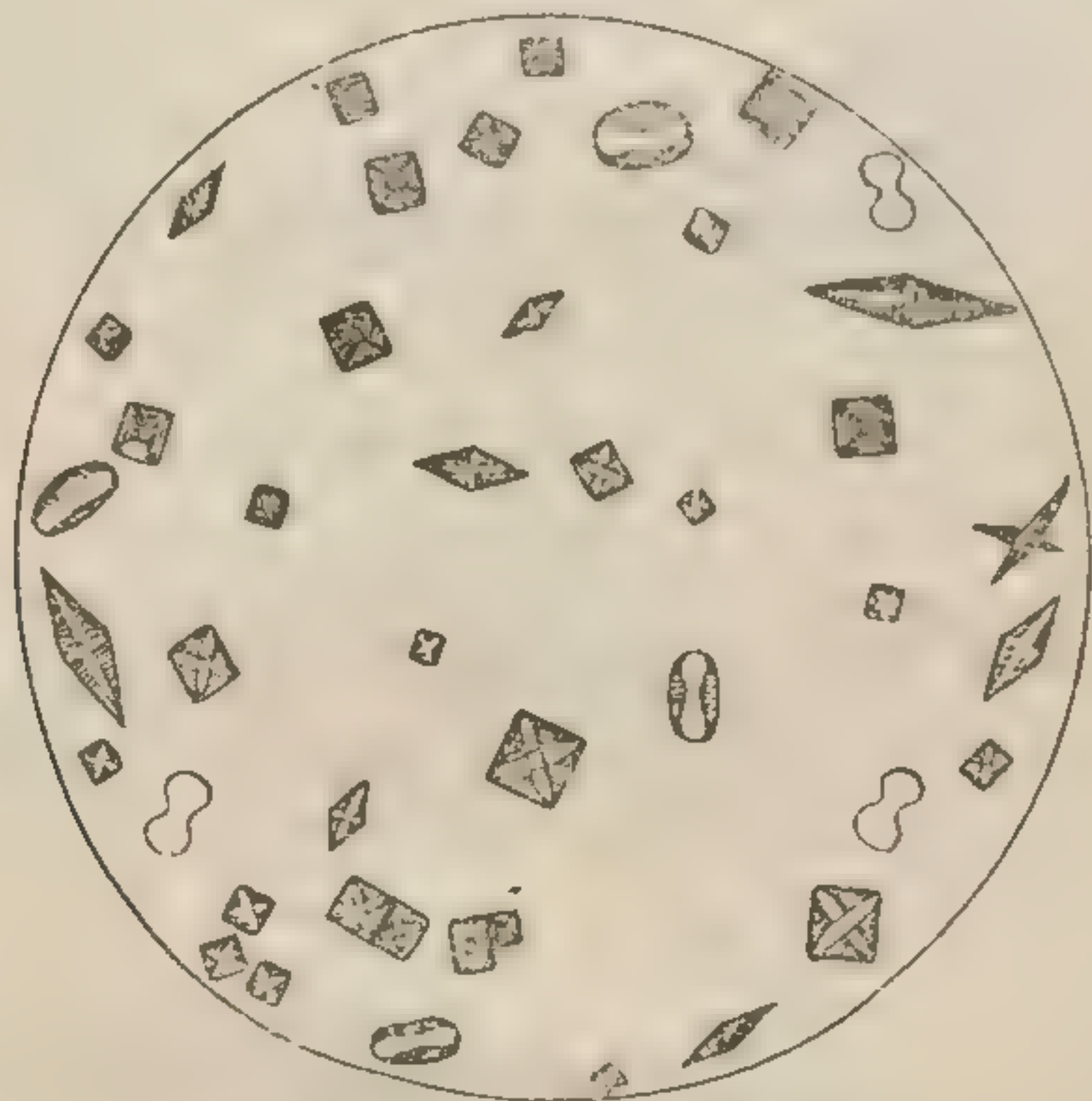


Рис. 41. Осадок щавелевокислого кальция в моче.

В щелочной моче встречаются фосфорнокислый магний-аммоний (трипельфосфат) (рис. 42), трехзамещенные фосфорнокислые соли щелочноземельных металлов, биурат аммония (рис. 43) и др.

Реже встречаются осадки белков и некоторых аминокислот (цистин, тирозин, лейцин); могут встречаться также жир и холестерин.

Если осадки накапливаются в мочевыводящих путях, они носят название мочевых сростков. Мочевые сростки нередко уплотняются с органическими веществами и по размерам могут дойти до величины куриного яйца, что может вызвать боли и закупорку мочевых путей.

Мелкие мочевые сростки называют песком, крупные — мочевыми камнями.



Рис. 42. Осадок фосфорнокислого
магний-аммония (трипельфосфат)
в моче.



Рис. 43. Осадок кислого мочекислового
аммония (биурат аммония) в моче.

В целях диагностики заболевания и применения правильного способа лечения в клинике производят анализ осадков и сростков мочи.

Чаще всего состав мочевых сростков бывает неоднородным и включает различные вещества.

Анализ основан на микроскопическом исследовании, химических испытаниях на растворимость и специфических реакциях веществ, встречаемых в осадках.

Мы ограничимся обнаружением в мочевых осадках или сростках уратов, фосфатов и оксалатов.

- П р и б о р ы.**
1. Ступка с пестиком.
 2. Штатив с пробирками.
 3. Воронка с фильтром.
 4. Крышка от тигля или фарфоровая чашечка.
 5. Микроскоп.
 6. Покровное и предметное стекла.
 7. Пипетка.
 8. Стеклянная палочка.

- Р е а к т и в ы.**
1. Соляная кислота, 10% раствор.
 2. Аммиак, 10% раствор.
 3. Уксусная кислота, 10% раствор.
 4. Азотная кислота, концентрированная.
 5. Мочевые осадки или сростки.
 6. Лакмусовая бумажка.

Х о д р а б о т ы

I. Помещают маленькую порцию осадка на предметное стекло, закрывают его покровным стеклом и рассматривают под микроскопом. По характерной форме кристаллов (рис. 27, 41, 42 и 43) определяют характер осадка.

II. 1. Осадок или камень растирают в ступке с 3 — 5 мл дистиллированной воды.

2. Переливают (по палочке) содержимое ступки в пробирку, добавляют 3 — 4 мл соляной кислоты и нагревают, встряхивая пробирку.

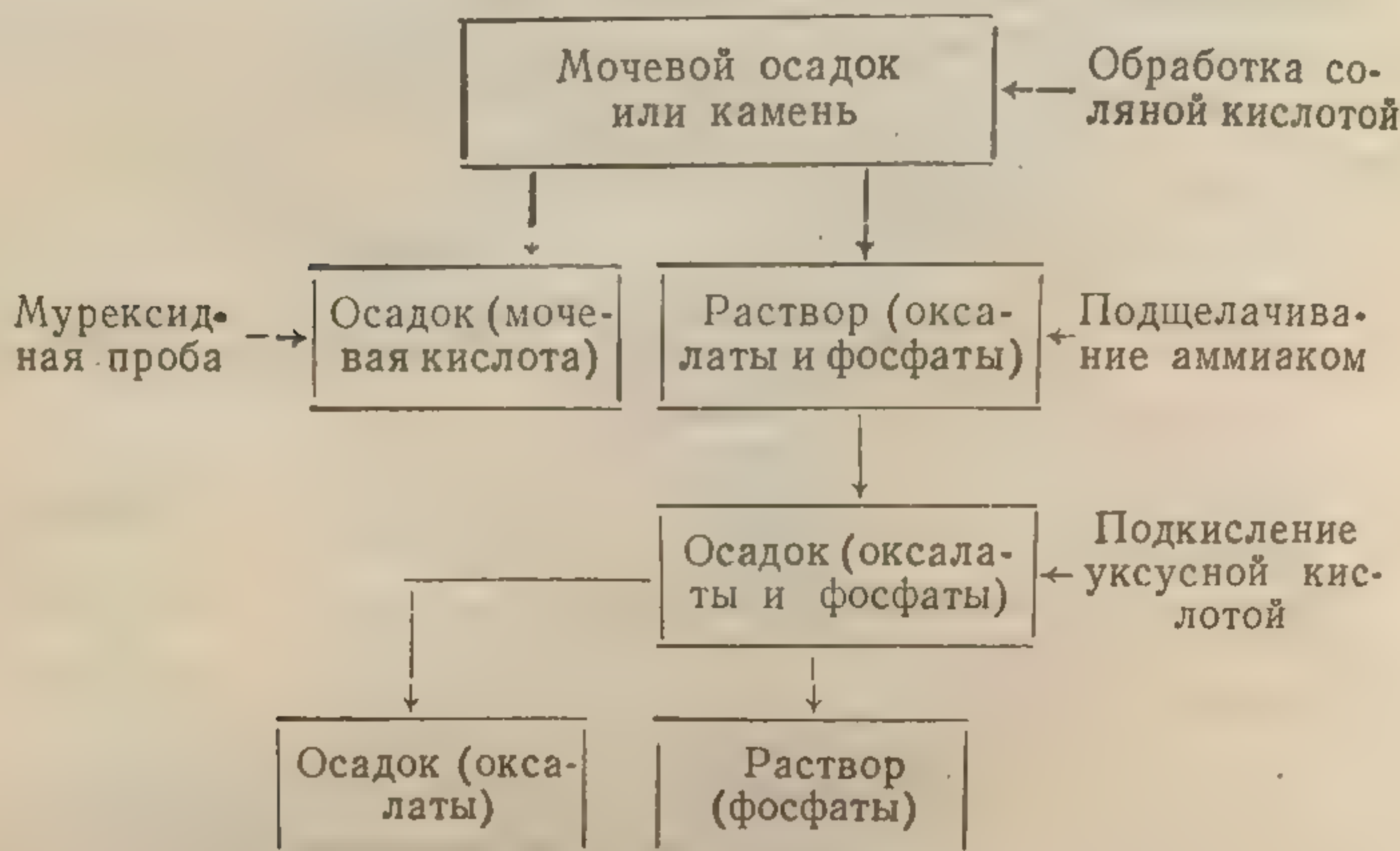
3. По охлаждении фильтруют. Наличие нерастворимого осадка указывает на присутствие мочевой кислоты, которую открывают мурексидной пробой (стр. 216).

4. К фильтрату добавляют раствор аммиака до явно щелочной реакции (резкий запах аммиака). При этом фосфаты и оксалаты выпадают в осадок.

5. Обрабатывают осадок уксусной кислотой до кислой реакции. При этом фосфаты вновь растворяются, а оксалаты остаются в осадке.

Приведенное краткое исследование можно представить следующей схемой:

Схема исследования мочевых осадков



Наличие ионов фосфорной и щавелевой кислот может быть дополнительно установлено обычными качественными реакциями на них — соответственно с молибденово-кислым аммонием и с хлористым кальцием (стр. 48 и 244).

МОЛОКО

Молоко является единственным питательным продуктом, которым нормально вскарммливаются дети, а также детеныши млекопитающих в течение первого периода жизни.

Молоко обладает высокой питательной ценностью и содержит почти все составные части, необходимые для питания. Состав молока различных животных неодинаков. На состав молока влияют также пища, климат и ряд других факторов.

Ввиду этого химический состав молока трудно выразить определенными величинами. В качестве примера мы приводим средние цифры состава молока в процентах (табл. 8).

Таблица 8
Химический состав молока

	Вода	Жир	Белок	Лакто- за	Минераль- ные веще- ства
Женское молоко	88,0	3,2	2,0	6,5	0,3
Молоко коровы	87,4	4,0	3,3	4,6	0,7
» овцы	83,0	5,3	6,3	4,6	0,8
» козы	87,0	4,3	3,1	4,8	0,8
» кобылы	89,5	2,0	1,7	6,5	0,3

Главнейшие различия между женским и коровьим молоком состоят в том, что женское молоко беднее казеином и богаче глобулином; беднее солями и богаче лактозой. В женском молоке $\frac{4}{5}$ количества фосфорной кислоты находятся в виде органических соединений, в коровьем — $\frac{1}{4}$ органического фосфора и $\frac{3}{4}$ неорганического.

Молоко богато кальцием и фосфором и поэтому хорошо обеспечивает организм этими элементами. Однако вследствие ничтожного содержания железа в молоке при одностороннем молочном питании в организме может образоваться недостаток железа.

Так как при стоянии молоко расслаивается (на поверхность всплывают капли жира — сливки), то перед исследованием его необходимо тщательно перемешивать¹.

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛОКА ПОД МИКРОСКОПОМ

Молоко представляет собой стойкую эмульсию молочного жира в водном растворе. Стойкость

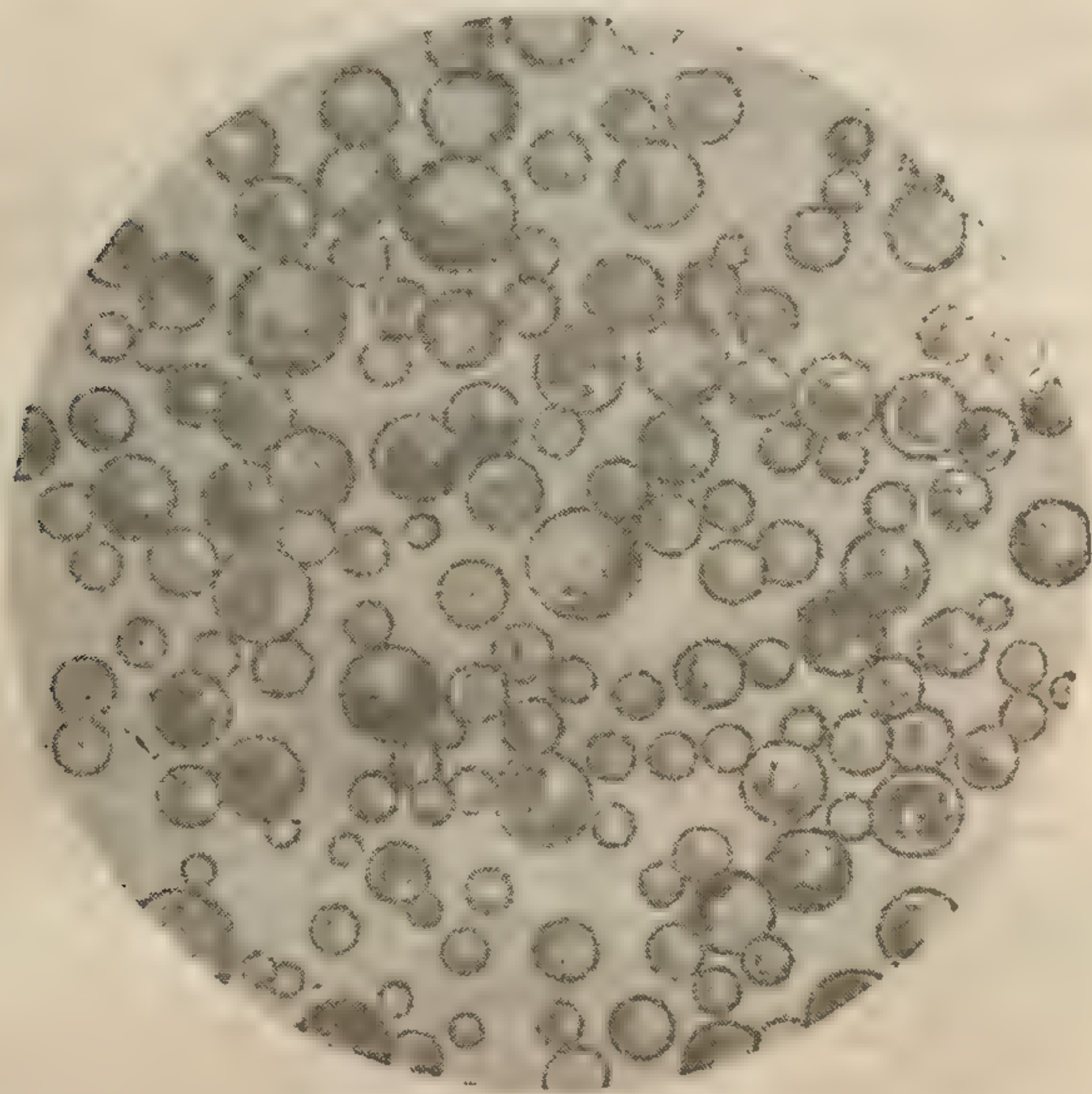


Рис. 44. Жировые шарики молока под микроскопом.

эмульсии зависит не только от растворенных в водной фазе веществ, но главным образом от наличия белковой оболочки вокруг мельчайших капелек жира.

Диаметр капелек жира в молоке колеблется от 0,5 до 20 μ , причем главная масса жировых шариков имеет диаметр от 1 до 4 μ и они легко различимы под микроскопом (рис. 44).

¹ Вопросы химии и исследования молока изучались в СССР главным образом А. А. Калантаром, Г. С. Иниховым и Р. Б. Давидовым.

- П р и б о р ы. 1. Микроскоп.
2. Предметное стекло.
3. Покровное стекло.
4. Пипетка.

Р е а к т и в ы. Молоко.

Х о д р а б о т ы

1. На предметное стекло наносят пипеткой каплю молока и накрывают покровным стеклом.
2. Рассматривают каплю под микроскопом (рис. 44).

БЕЛКИ МОЛОКА

В состав молока входят казеиноген¹, молочный альбумин и молочный глобулин.

Казеиноген является фосфопротеидом и находится в молоке в виде кальциевых солей. При подкислении среды до изоэлектрической точки казеиногена ($pH = 4,6$) он выпадает в осадок (скисание молока). При ферментативном свертывании (стр. 54 и 310) казеиноген при участии солей кальция переходит в нерастворимый казеин. Казеиноген выпадает в осадок также при полунасыщении раствора сернокислым аммонием.

Молочный альбумин свертывается при нагревании до 75° и выше. Коагуляция альбумина молока может наступить уже при 60° , если действие температуры продолжительно. Молочный альбумин, как и все альбумины (стр. 20) высаливается при насыщении раствора сернокислым аммонием.

Глобулин молока свертывается при нагревании до 75° в слабокислой среде. Высаливается он, как и казеиноген, при полунасыщении раствора сернокислым аммонием (стр. 20).

- П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.
2. Воронка с фильтром.
3. Пипетка.

- Р е а к т и в ы. 1. Уксусная кислота, 1% раствор.
2. Углекислый натрий, 1% раствор.
3. Сернокислый аммоний, насыщенный раствор.

¹ Иногда (в особенности в иностранной литературе) казеиноген молока называют казеином, а продукт ферментативного свертывания казеиногена — казеин — параказеином.

4. Сернокислый аммоний, кристаллический, измельченный.
5. Молоко.

Ход работы

I. 1. В пробирку наливают около 1 мл молока и 2 — 3 мл воды.

2. Перемешивают и, продолжая встряхивать, добавляют по каплям раствор уксусной кислоты до прекращения выпадения хлопьевидного осадка казеиногена (в избытке кислоты осадок растворяется).

3. Содержимое пробирки фильтруют в другую пробирку и промывают осадок на фильтре 2 — 3 мл воды.

На фильтре остается осадок казеиногена, который захватывает и жир молока.

4. К фильтрату с промывными водами добавляют 2 — 3 капли раствора соды (до слабокислой реакции на лакмус) и кипятят. Выпадает осадок молочного альбумина и молочного глобулина.

II. 1. В пробирку наливают 2 — 3 мл молока, добавляют равный объем насыщенного раствора сернокислого аммония и перемешивают. В получившемся полунасыщенном растворе сернокислого аммония выпадает осадок, состоящий из казеиногена и молочного глобулина.

2. Отфильтровывают содержимое пробирки от выпавшего осадка. К полученному фильтрату добавляют при помешивании сухого сернокислого аммония до полного насыщения раствора. Выпадает осадок молочного альбумина.

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ СВЕРТЫВАНИЕ КАЗЕИНОГЕНА ПЕПСИНОМ

И. П. Павловым и С. В. Паращуком было доказано, что пепсин обладает створаживающим действием и свертывает молоко в кишечном тракте. Специальный створаживающий (сычужный) фермент — химозин (стр. 54) присутствует только в желудке (сычуге) молодых телят и исчезает в зрелом возрасте.

Оптимум створаживающего действия пепсина в отличие от его протеолитического действия лежит при $pH = 4,8$. Створаживать молоко в определенных условиях могут и другие протеолитические ферменты.

П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.
2. Водяная баня.
3. Термометр.

Р е а к т и в ы. 1. Пепсин, 0,1% раствор, подкисленный соляной кислотой до $pH=4,8-5,0$ и дистиллированная вода, подкисленная соляной кислотой (см. приготовление стр. 327, п. 31).
2. Молоко некипяченое.

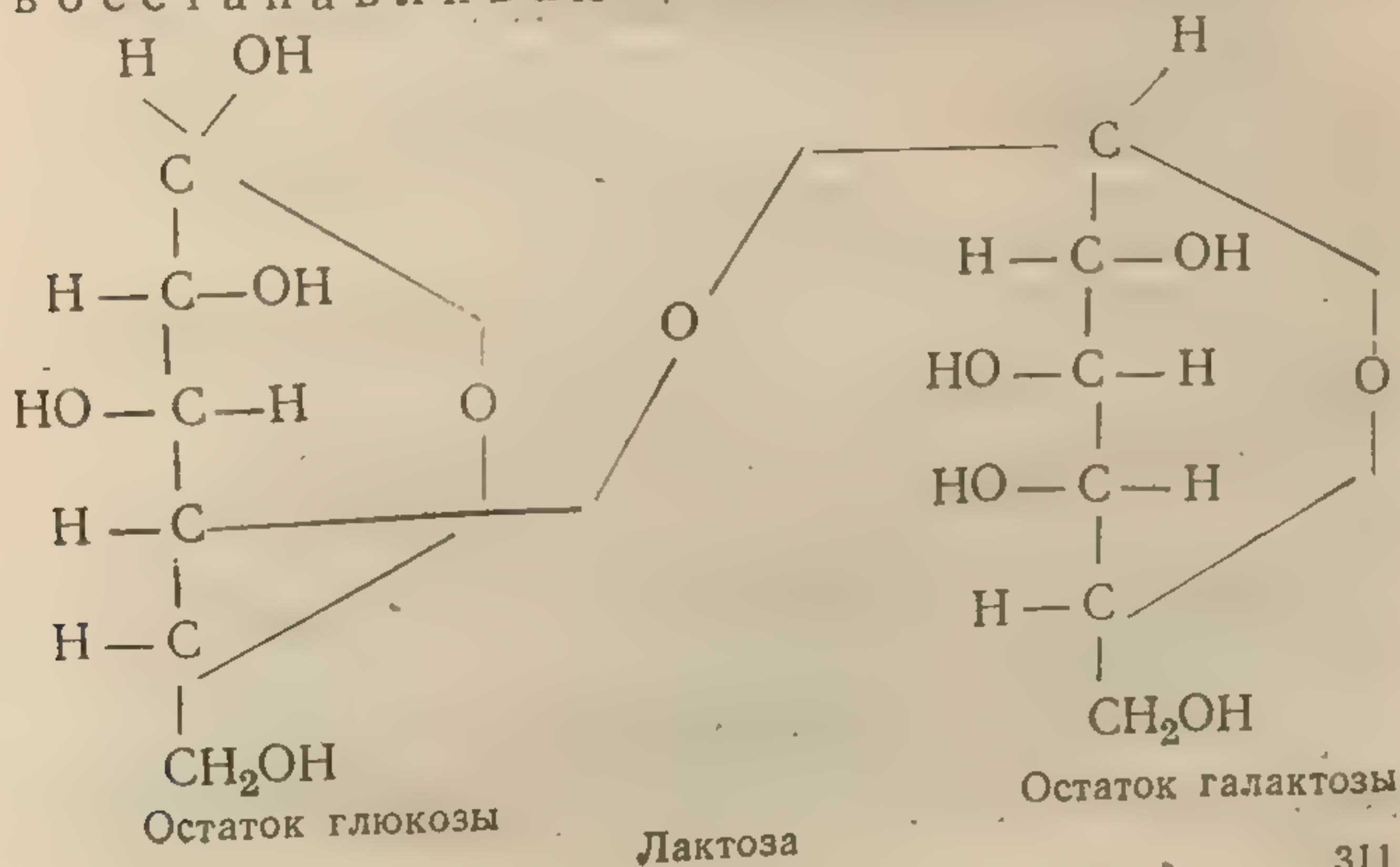
Х о д р а б о т ы

1. В пробирку наливают 1 — 2 мл молока и добавляют равный объем раствора пепсина. В другой пробирке для контроля 1 — 2 мл молока смешивают с равным объемом воды.

2. Обе пробирки ставят на водяную баню при $38-40^{\circ}$. Через 30 — 40 минут в пробирке с пепсином молоко свертывается. Далее сгусток казеина отжимает сыворотку и уплотняется.

РЕАКЦИИ НА МОЛОЧНЫЙ САХАР

Молоко содержит значительное количество молочного сахара (лактозы). Л а к т о з а представляет собой д и с а х а р и д, состоящий из остатков г л ю к о з ы и г а л а к т о з ы, причем первый углеродный атом галактозы соединен с четвертым углеродным атомом глюкозы. Первый углеродный атом глюкозы сохраняет свой полуацетальный (глюкозидный) гидроксил и обладает вследствие этого восстанавливающими свойствами.



Для обнаружения лактозы в молоке осаждают белки гидратом окиси меди и по восстановлению меди в безбелковом фильтрате (реакции Троммера или с фелинговой жидкостью) открывают присутствие сахара.

П р и б о р ы. 1. Пипетка на 5 мл с делениями.
2. Мерный цилиндр на 50 мл.
3. Воронка с фильтром.
4. Коническая колбочка.
5. Штатив с пробирками.

Р е а к т и в ы. 1. Сернокислая медь, 5% раствор.
2. Едкий натр, 10% раствор.
3. Фелингова жидкость (приготовление см. стр. 333, п. 59).
4. Молоко.

Х о д р а б о т ы

1. В коническую колбочку отмеривают 2,5 мл молока, 46 мл воды, 1,5 мл раствора сернокислой меди и 0,15 мл раствора едкого натра, перемешивают и оставляют на 30 минут. Выпадает осадок белков молока.

2. Отфильтровывают содержимое колбочки в пробирку и с полученным безбелковым фильтратом проделывают реакции Троммера и с фелинговой жидкостью (стр. 131 и 132).

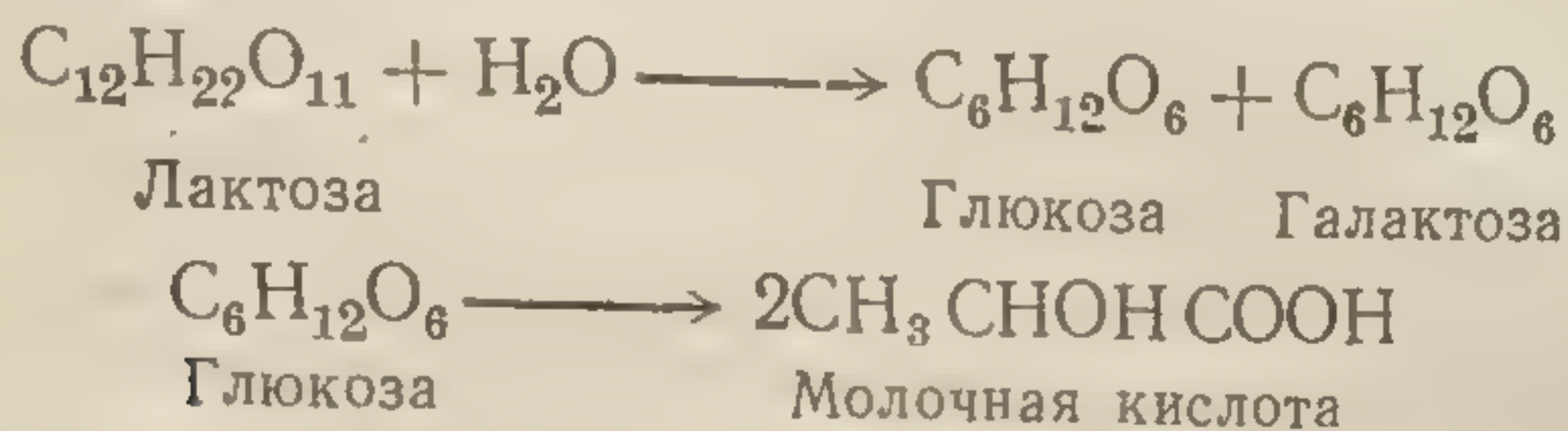
ОБНАРУЖЕНИЕ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В КИСЛОМ МОЛОКЕ

Свежее молоко не содержит молочной кислоты. При стоянии молоко скисает и в нем образуется молочная кислота вследствие брожения сахара под действием молочнокислых бактерий.

Микроорганизмы, попадающие в свежее молоко, не выживают, так как молоко обладает бактерицидными свойствами. Бактерицидные свойства молока сохраняются при комнатной температуре обычно не более суток и с их утерей в молоке могут развиваться различные микроорганизмы. Под влиянием микроорганизмов свойства молока глубоко изменяются, что находит практическое применение при приготовлении ряда молочных продуктов (простокваша, кефир, кумыс, сырки, творог, сметана и т. п.).

При стоянии в теплом месте в молоке преимущественно развиваются молочнокислые бактерии, которые

разлагают лактозу на моносахариды и сбраживают последние до молочной кислоты:



Вследствие сдвига реакции в кислую сторону казеиноген выпадает в осадок (творог) и получается кислое молоко (простокваша).

Образовавшуюся молочную кислоту обнаруживают, отфильтровав небольшое количество молочной сыворотки и добавляя ее по каплям к реактиву на молочную кислоту (см. стр. 261).

РЕАКЦИЯ УМИКОВА НА ОТЛИЧИЕ ЖЕНСКОГО МОЛОКА ОТ КОРОВЬЕГО

Женское молоко при нагревании до 60° с аммиаком окрашивается в фиолетовый цвет. Реакцию Умикова дает только женское молоко, благодаря чему ею пользуются для отличия женского молока от коровьего.

Интенсивность реакции зависит от лактационного периода. Чем позднее этот период, тем реакция интенсивнее.

П р и б о р ы. 1. Штатив с пробирками.
2. Водяная баня.
3. Термометр.

Р е а к т и в ы. 1. Женское молоко.
2. Коровье молоко.
3. Аммиак, 10% раствор.

Х о д р а б о т ы

1. В одну пробирку наливают 1 — 2 мл женского молока, в другую пробирку — 1 — 2 мл коровьего молока.

2. В обе пробирки добавляют по 1 — 2 мл раствора аммиака и помещают их в водяную баню при 60°.

Наблюдают появление фиолетового окрашивания в первой пробирке (женское молоко) и отсутствие окрашивания во второй пробирке (коровье молоко).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УДЕЛЬНОГО ВЕСА МОЛОКА

Удельный вес женского молока близок к 1,030 и колеблется обычно в незначительных пределах. Удельный вес нормального сборного коровьего молока лежит в пределах 1,028 — 1,034.

Определение удельного веса коровьего молока имеет большое практическое значение. Если разбавить молоко водой, то произойдет уменьшение удельного веса; если же снять сливки или прибавить к цельному молоку снятого молока, удельный вес возрастает. Таким образом, определением удельного веса можно обнаружить фальсификацию молока и до некоторой степени установить характер этой фальсификации. Если одновременно снять сливки и прибавить воды, то молоко может иметь нормальный удельный вес, хотя и будет дважды фальсифицировано. В этом случае фальсификацию легко можно обнаружить, определив процент жира в молоке (стр. 316).



Рис. 45.
Ареометр
для
молока
(лактоден-
симетр)

Удельный вес молока обычно определяют с помощью специальных ареометров (лактоденсиметров или лактометров) (рис. 45), градуированных при 20°.

Удельный вес молока обычно выражают в «градусах» ареометра. Градусы лактоденсиметра соответствуют тысячным долям числа, выражающего истинный удельный вес молока. Например, отсчет лактоденсиметра 30° соответствует удельному весу молока 1,030¹.

Хотя молочный ареометр градуируется при 20°, определение удельного веса допускается при температуре молока от 10° до 25°. Если удельный вес молока определялся при температуре выше 20°, то для приведения его к 20° на каждый

¹ Молочные ареометры, градуированные при 20°/4°, изготавливаются в СССР сравнительно недавно. Если определение производилось лактоденсиметром старого типа, градуированным при 15°/15°, то из его показания для перевода в градусы ареометра, градуированного при 20°/4° следует вычесть 2. Например, если показание 32, то при 20°/4° данное молоко имеет 30° (удельный вес 1,030).

градус температуры выше 20° к найденной величине «градуса» ареометра прибавляют 0,2, а при измерении при температуре ниже 20° на каждый градус ниже 20° вычитают 0,2.

Для определения удельного веса молоко следует брать не раньше 2 часов после дойки, так как удельный вес, определенный в молоке сейчас же после дойки, меньше удельного веса, определенного через 2 часа. Это явление объясняется тем, что жир в только что выдоенном молоке находится в жидком состоянии; через некоторое время он меняет свое состояние, уменьшая свой объем.

П р и б о р ы. 1. Лактоденсиметр.
2. Высокий цилиндр.

Р е а к т и в ы. Молоко.

Х о д р а б о т ы

1. Тщательно перемешивают исследуемое молоко и осторожно наливают его в цилиндр, следя за тем, чтобы не образовалось пены (которая мешает отсчету по шкале лактоденсиметра).

2. Медленно погружают сухой лактоденсиметр в исследуемое молоко до 30-го деления.

3. Через 2 — 3 минуты производят отсчет по шкале на месте соприкосновения поверхности молока с делением ареометра (по верхнему мениску).

4. Определяют температуру молока (шкала термометра находится в верхней части лактоденсиметра), вводят поправку на разность температур и вычисляют удельный вес молока.

Приведем пример:

Показатель лактоденсиметра	30,3
Температура молока	17°
Температурная разница	$20 - 17 = 3^{\circ}$
Поправка на температуру	$0,2 \cdot 3 = 0,6$
Показание лактоденсиметра с поправкой на температуру	$30,3 - 0,6 = 29,7$
Удельный вес молока	1,0297

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОТНОСТИ МОЛОКА

Свежее молоко может связывать довольно определенное количество щелочи. Это объясняется главным образом наличием в молоке белков и кислых солей, которые и связы-

вают щелочь. При стоянии кислотность молока повышается за счет сбраживания молочного сахара в молочную кислоту под влиянием молочнокислых бактерий.

Кислотность молока обычно принято выражать в г р а дусах кислотности, обозначающих количество миллилитров 0,1 нормальной щелочи, идущее на нейтрализацию 100 мл исследуемого молока (индикатор—фенолфталеин).

Свежевыдоенное молоко коровы имеет кислотность 15 — 18°; продажное молоко — 20 — 22°; не свернувшееся, но свертывающееся при кипячении — 24 — 27°.

Кислотность женского молока, а также молока кобылы и ослицы ниже кислотности молока коровы. Женское молоко имеет 1 — 9°, молоко кобылы и ослицы — около 6°. На лакмус женское молоко и молоко кобылы имеют ясно выраженную щелочную реакцию.

П р и б о р ы. 1. Коническая колба.
2. Пипетки на 10 и 20 мл.
3. Бюретка.

Р е а к т и в ы. 1. Едкий натр, 0,1 н. раствор.
2. Фенолфталеин, 0,1% раствор в спирте.
3. Молоко.

Х о д р а б о т ы

1. Отмеривают в колбу 10 мл исследуемого молока.
2. Добавляют 20 мл дистиллированной воды и несколько капель раствора фенолфталеина.

3. Взбалтывают и оттитровывают щелочью до появления не исчезающего в продолжение 2 минут розового окрашивания. Титрование необходимо вести при тщательном помешивании содержимого колбы.

4. Умножают количество миллилитров 0,1 н. щелочи, затраченное на титрование, на 10 (для пересчета на 100 мл).

Результат выражает кислотность исследуемого молока в градусах кислотности.

* КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИРА В МОЛОКЕ

Содержание жира является важнейшим показателем качества молока. Количественное определение жира в молоке поэтому широко применяется в молочной промышленности и при оценке молока в качестве пищевого продукта.

При действии на молоко крепкой серной кислоты стойкость жировой эмульсии понижается и нагретый жир может легко отделиться при центрифугировании в виде прозрачного столбика. Быстрому слипанию капелек жира способствует изоамилово-серный эфир, который образуется при прибавлении изоамилового спирта. Определение жира ведут в специальных приборах — б у т и р о м е т р а х (рис. 46).

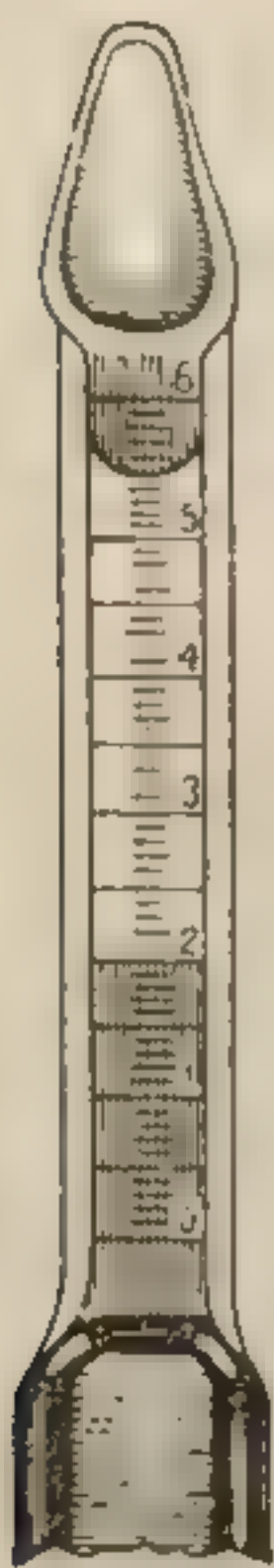


Рис. 46.
Бутирометр
для молока.

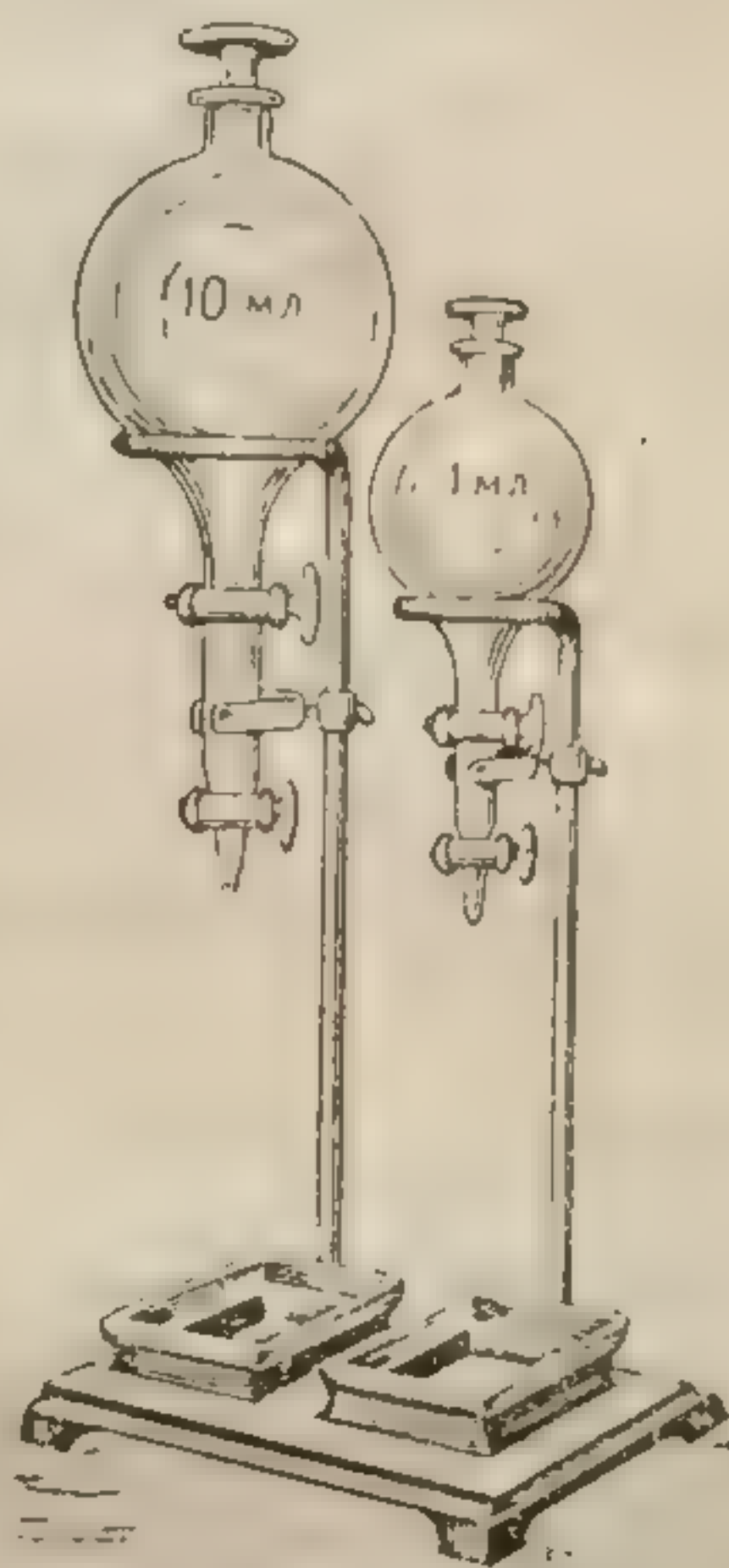


Рис. 47. Приборы для
отмеривания серной кислоты
и изоамилового спирта.

- П р и б о р ы.
1. Специальные приборы для отмеривания серной кислоты и изоамилового спирта (рис. 47).
 2. Пипетка на 11 мл для отмеривания молока.
 3. Штатив с бутирометрами.
 4. Водяная баня.
 5. Термометр.
 6. Специальная центрифуга для бутирометров (рис. 48).

- Р е а к т и в ы. 1. Серная кислота, удельного веса 1,82 (приготовление см. стр. 332, п. 54).
2. Изоамиловый спирт.

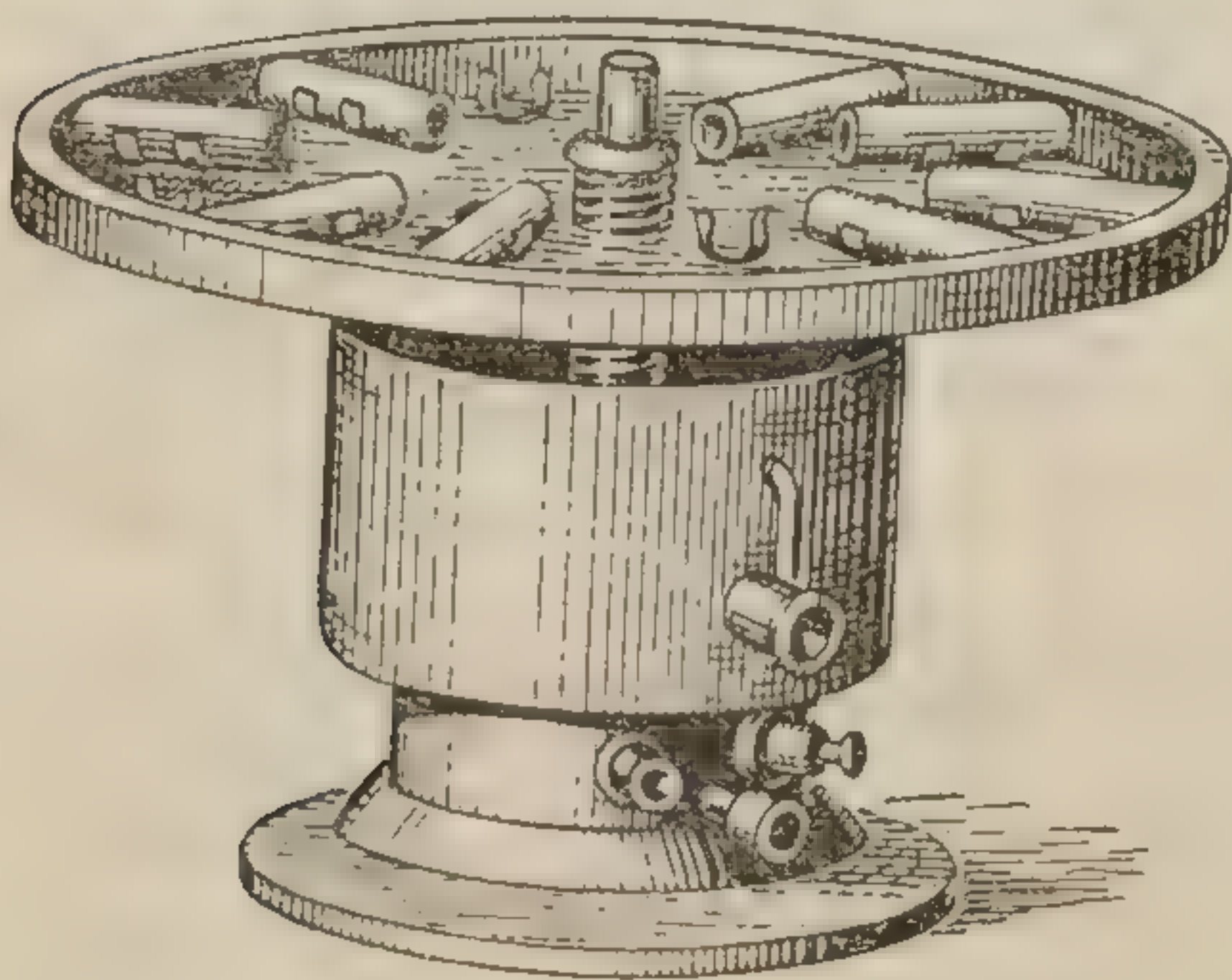


Рис. 48. Центрифуга для бутирометров.

Х о д р а б о т ы

1. Отмеривают в бутирометр с помощью специального прибора 10 мл серной кислоты¹.

2. Приливают в бутирометр специальной пипеткой 11 мл исследуемого молока, стараясь не смешивать молоко с серной кислотой, что достигается выпусканьем струи молока по стенке бутирометра.

3. Добавляют с помощью специального прибора или пипетки 1 мл изоамилового спирта.

Вышеуказанная последовательность заполнения бутирометра обязательна. В противном случае при непосредственном смешивании изоамилового спирта с серной кислотой образуются вещества (например, амилен), которые, переходя в дальнейшем в столбик жира, дают завышенные результаты.

4. Плотнo закрывают бутирометр резиновой пробкой и осторожно перемешивают содержимое, придерживая пробку большим пальцем.

¹ При отсутствии специального прибора можно отмерить цилиндром.

Необходимо иметь в виду, что при перемешивании бутирометр сильно нагревается.

5. Ставят бутирометр в водяную баню при 65° на 3 — 5 минут.

6. Вставляют бутирометр (пробкой к периферии) в диск специальной центрифуги. Если определение ведут не с серией четного числа бутирометров, а с одним или вообще с нечетным числом бутирометров, то для уравнивания диска центрифуги наполняют один бутирометр водой, а затем распределяют бутирометры в центрифуге симметрично.

7. Центрифугируют в продолжение 5 минут.

8. Помещают бутирометр (пробкой вниз) на 3 минуты в водяную баню при 65° и производят отсчет процента жира по шкале бутирометра.

* КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ В МОЛОКЕ

В молоке различают три белковые фракции: 1) казеиноген, 2) молочный альбумин и 3) молочный глобулин.

Кроме этих белков, в молоке были найдены и некоторые другие белки. К ним следует причислить опализин, выделенный из сыворотки женского молока высаливанием хлористым натрием. Имеются также указания на присутствие в молоке белка, похожего на проламин. Однако эти белки (кроме казеиногена, альбумина и глобулина) находятся в молоке в весьма незначительных количествах и в настоящее время мало изучены.

Определение общего количества белков в молоке сводится к определению в точно взятой навеске молока азота по Кьельдалю (стр. 167). Полученную цифру общего азота умножают на коэффициент 6,45 (принимая содержание азота в белках молока равным 15,5% и считая весь азот принадлежащим белку) и в итоге получают количество белков в молоке¹.

Определение производят по методу Кьельдаля так же, как было описано для белков сыворотки крови (стр. 167). Для работы необходимы указанные на стр. 167 приборы

¹ Так как содержание азота в большинстве белков составляет около 16%, то в качестве коэффициента пересчета на белок обычно пользуются величиной 6,25 ($100 : 16 = 6,25$). В казеиногене молока содержание азота принимают за 15,5%. Поэтому в данном случае пользуются коэффициентом 6,45 ($100 : 15,5 = 6,45$).

и реактивы и, кроме того, весовой стаканчик с притертой пробкой для взятия навески.

В стаканчик наливают несколько миллилитров молока, закрывают его пробкой и взвешивают на аналитических весах.

Отливают в колбу для сжигания около 1 мл молока и снова точно взвешивают стаканчик. Разность веса стаканчика до и после отливания даст взятую для определения навеску молока.

Далее, сжигают навеску молока с серной кислотой, отгоняют аммиак и определяют его титрованием.

Полученное количество азота умножают на 6,45 для вычисления количества белка и последнее рассчитывают в процентах от навески молока.

1. А б
по
с
ва
сп
ко
сп
сн
гр
ст
хо
ме
хо
со
та

99
ме
ни
по
об

2. А э
р
1
по
до
го
зо

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАКТИВОВ

1. **Абсолютный этиловый спирт.** Если крепость спирта ниже 95%, то его сначала перегоняют с дефлегматором. Далее в круглодонную колбу наливают (несколько меньше половины ее объема) 95% спирта и прибавляют куски негашеной извести в таком количестве, чтобы они выступали над поверхностью спирта. Соединяют колбу с обратным холодильником, снабженным хлоркальциевой трубкой; осторожно нагревают на водяной бане в течение часа и оставляют стоять на 2 дня. Через 2 дня отгоняют спирт с помощью холодильника. В качестве приемника следует применять бунзеновскую колбу, плотно соединив ее с холодильником, а к отводной трубке колбы присоединять хлоркальциевую трубку. Обработанный таким образом спирт имеет крепость около 99,5%.

При необходимости полнее удалить влагу к 1 л 99,5% спирта добавляют 27,5 г диэтилфталата и 7 г металлического натрия, смесь кипятят 1 час с обратным холодильником и перегоняют, защищая спирт от попадания влаги из воздуха. Обработанный таким образом спирт имеет крепость около 99,95%.

2. **Азотнокислое серебро, 0,01 н. и 0,171 н. растворы.** Отвешивают на аналитических весах 1,6987 г химически чистого азотнокислого серебра, помещают в мерную литровую колбу, растворяют и доливают дистиллированной водой до метки. Для приготовления 0,171 н. раствора берут соответственно 29,06 г AgNO_3 .
3. **Аммиак, 1% раствор, не содержащий CO_2 .** К 1% раствору аммиака добавляют немного насыщенного раствора Ba(OH)_2 . Осадок BaCO_3 отфильтровывают. Избыток бария осаждают сернокислым аммонием и снова отфильтровывают.

4. Аммиачный раствор серебра. К 5% раствору азотнокислого серебра добавляют концентрированный раствор аммиака до растворения выпадающего осадка.
5. Бромноватистокислый натрий. 300 г едкого натра растворяют в 1 л воды, охлаждают и прибавляют (под тягой), осторожно и постоянно помешивая, 50 г чистого брома (около 16 мл). Раствор хранят в темной склянке. Он не портится в продолжение — 3 месяцев.
6. Вытяжка липазы. Поджелудочную железу (свиньи, быка или другого животного) очищают от жира, пропускают через мясорубку и тщательно растирают в ступке с тройным количеством воды. Полученный экстракт процеживают через 2 — 3 слоя марли.
7. Вытяжка из тонких кишок. Кусок тонкой кишки (свиньи или какого-нибудь другого животного) длиной около 50 см разрезают в длину, промывают водой и соскабливают слизистую оболочку ножом или куском стекла. Отделенную слизистую растирают в ступке с песком. Добавляют около 5 объемов воды и 1 — 2 мл хлороформа и оставляют при комнатной температуре на 24 часа. По истечении этого срока вытяжку процеживают через полотно. Экстракт содержит эрепсиновый комплекс, а также фосфатазу, сахаразу, мальтазу и некоторые другие ферменты.
8. Вытяжка из хрена. 100 г измельченного хрена настаивают 3 — 4 часа со 100 мл 0,05% раствора углекислой соды и фильтруют.
9. Вытяжка трипсина в растворе двууглекислой соды. Поджелудочную железу измельчают и на другой день извлекают трех-четыре-кратным количеством 0,03% аммиака в течение суток (необходим толуол). Далее вытяжку фильтруют, к фильтрату добавляют разведенную уксусную кислоту и получают осадок, который отфильтровывают и потом растворяют в 0,5% растворе NaHCO_3 . К полученному раствору для активации трипсина добавляют вытяжку из тонких кишок (п. 7) (энтерокиназа).
10. Гваяковая смола, спиртовой раствор. 1 — 2 г гваяковой смолы растворяют в 100 мл 95% этилового спирта.

11. **Гипосульфит**, 0,005 н. раствор. Каждый раз проверяют по титрованному раствору KJO_3 . Для приготовления 0,005 н. раствора иодноватокислого калия отвешивают 0,3567 г KJO_3 и растворяют в мерной колбе на 2 л дважды дистиллированной водой, которую приливают до метки. Проверку титра раствора гипосульфита производят, отмеривая в колбочку 2 мл раствора иодноватокислого калия, прибавляя 2 мл 3% раствора уксусной кислоты, 3 мл тройного хлорцинк-иодистого раствора (п. 57), 2 капли раствора крахмала и титруя выделившийся иод раствором гипосульфита из микробюретки.
12. **Гликоген**. Животному (например, кролику) дают обильную порцию углеводной пищи (картофель, морковь и т. п.). Через 6 — 8 часов животное убивают, быстро вырезают печень и тотчас, разрезав на куски, растирают с отмытым песком. Продолжая растирать, добавляют $1\frac{1}{2}$ объема 3% трихлоруксусной кислоты и отсасывают. Фильтрат собирают в стакан. Остаток вторично экстрагируют равным объемом 3% трихлоруксусной кислоты. К соединенному фильтрату добавляют равный объем 95% спирта при помешивании. Осадок гликогена отделяют центрифугированием. Полученный осадок растворяют, взбалтывая с 2—3 объемами воды, и снова осаждают равным (по отношению к воде) объемом спирта. Эту операцию повторяют 3 — 4 раза. Далее гликоген дважды промывают 95% спиртом и высушивают в эксикаторе над хлористым кальцием.
13. **Двухромовокислый калий**, постоянный стандартный раствор для определения креатинина. 24,54 г чистого, высушенного до постоянного веса при 110° бихромата калия помещают в мерную литровую колбу, растворяют и доводят дистиллированной водой до метки.
14. **Диазореактив**. Диазореактив готовят в день занятия из основного раствора сульфаниловой кислоты. 0,9 г сульфаниловой кислоты растворяют в 9 мл концентрированной соляной кислоты и доводят водой до 100 мл; сохраняют в темной склянке. Этот основной раствор сульфаниловой кислоты может сохраняться годами.

1,5 мл основного раствора сульфаниловой кислоты наливают в стоящую во льду мерную колбу на 50 мл, добавляют 1,5 мл свежеприготовленного 5% раствора азотистокислого натрия. После пятиминутного стояния во льду добавляют при взбалтывании еще 6 мл 5% раствора азотистокислого натрия. Через минуту постепенно добавляют (при охлаждении) воды до метки. Взбалтывают и оставляют раствор на льду на 15 минут. Раствор диазореактива может сохраняться на льду в течение суток.

15. Д и ф е н и л а м и н о в ы й р е а к т и в. К 100 мл 1% раствора дифениламина в ледяной уксусной кислоте добавляют 2,75 мл концентрированной серной кислоты.
16. 2,6-Д и х л о р ф е н о л и н д о ф е н о л, натриевая соль, 0,001 н. раствор. Для приготовления этого реактива применяют буферную фосфатную смесь по Серенсену, так как индикатор в водном растворе довольно быстро разрушается. Для этого берут водные растворы KH_2PO_4 — 9,078 г в 1 л и $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 11,867 г в 1 л. Растворы хранят отдельно. Затем их смешивают в отношении $\frac{\text{KH}_2\text{PO}_4}{\text{Na}_2\text{HPO}_4} = \frac{2}{3}$; тогда рН будет 7,0 — 6,9.

Отвешивают 0,25 г красителя, приливают 700 мл дистиллированной воды, взбалтывают и добавляют 300 мл буферной смеси. На следующий день раствор отфильтровывают и тщательно перемешивают. В приготовленном таким образом растворе определяют титр по титрованному раствору соли Мора.

Точно отмеривают в маленькую коническую колбочку 10 мл раствора индикатора, добавляют 5 мл насыщенного раствора щавелевокислого аммония и титруют из микробюретки раствором соли Мора до тех пор, пока голубой цвет индикатора не сменится на соломенножелтый. Для получения 0,01 н. раствора соли Мора 3,92 г соли растворяют в 1 л 0,02 н. серной кислоты. Титр соли Мора устанавливают по 0,01 н. раствору марганцовокислого калия.

17. Ж е л е з о с и н е р о д и с т ы й к а л и й, щелочной 0,005 н. раствор. Отвешивают на аналитических весах 1,65 г химически чистого $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Препарат необходимо проверить на отсутствие: а) солей трехвалентного железа и б) железистосинеродистых соединений. Это делается так: а) к 5 мл 5% раствора испытуемого препарата прибавляют одну каплю 10% серной кислоты и одну каплю 10% раствора железистосинеродистого калия; в присутствии трехвалентного железа получится синее окрашивание; б) к 1 мл 5% раствора испытуемого препарата прибавляют несколько капель 1% раствора FeCl_3 и несколько капель нормального раствора соляной кислоты; при положительной реакции наблюдается синее окрашивание. Навеску переносят в мерную колбу на 1 л, растворяют в дистиллированной воде, прибавляют в колбу 10,6 г предварительно прокаленного безводного углекислого натрия и доливают колбу дистиллированной водой до метки. Раствор хранят в темной склянке, предварительно выщелоченной водяным паром.

18. **Ксантгидрол.** 150 г едкого натра растворяют в 1 200 мл спирта. Прибавляют 45 г ксантона и 45 г цинковой пыли (мелкими порциями, при взбалтывании). Получается синяя окраска, переходящая в зеленую и при стоянии — в желтую. Когда добавлена вся цинковая пыль, смесь продолжают взбалтывать в течение 3 часов. Затем смесь отфильтровывают через складчатый фильтр в большой объем воды (8 — 10 л). Выпадает желтоватый осадок ксантгидрола. Осадок отсасывают, промывают водой и сушат в темном эксикаторе над серной кислотой. В сухом виде ксантгидрол неустоек, поэтому раствор следует готовить вскоре после получения препарата.
19. **Магнезимальная смесь.** 3,5 г хлористого магния, 1,8 г хлористого аммония и 2 мл 25% аммиака доводят водой до объема 100 мл.
20. **Молибденовокислый аммоний, раствор в азотной кислоте.** 7,5 г молибденовокислого аммония растворяют в 100 мл воды и добавляют 100 мл 32% азотной кислоты (удельного веса 1,2). Полное растворение молибденовокислого аммония происходит после добавления азотной кислоты.
21. **Молибденовокислый аммоний 2,5% раствор в 5 н. растворе серной кислоты.** 2,5 г молибденовокислого аммония раство-

ряют в 50 мл 10 н. раствора H_2SO_4 и доводят объем раствора водой до 100 мл.

22. **Монобромуксусная кислота.** В круглодонную колбу на 200 — 300 мл, снабженную обратным холодильником и капельной воронкой, помещают 12,5 мл ледяной уксусной кислоты, 0,75 г серного цвета и 2 — 3 кусочка прокаленного пористого фарфора (для равномерного кипения). Колбу нагревают на масляной бане. Когда уксусная кислота начинает кипеть, прибавляют по каплям 11,5 мл сухого брома (бром наливают в капельную воронку мелкими порциями). Нагревание продолжают некоторое время до удаления избытка брома.

Содержимое колбы отгоняют под вакуумом, собирая фракцию, кипящую при $117 - 118^\circ$ при остаточном давлении в 15 мм ртутного столба. Полученную монобромуксусную кислоту хранят плотно закрытой, так как она нестойка, очень гигроскопична и сильно разъедает кожу.

Для получения ледяной уксусной кислоты концентрированную уксусную кислоту ставят в снег. Когда большая часть кислоты закристаллизуется, жидкость сливают, кристаллическую массу расплавляют и повторяют эту операцию еще раз.

Сухой бром получают путем 2 — 3-кратного осторожного встряхивания в делительной воронке 15 — 20 мл брома с 5 — 7 мл концентрированной серной кислоты и последующего отделения слоя брома.

23. **Мышечная каша, отмытая.** Около 100 г мышц кролика или другого лабораторного животного пропускают через мясорубку, промывают на марле водой и отжимают. Отмытые мышцы заливают физиологическим раствором.
24. **Мышечная каша, свежая.** Мышцы свежееубитого животного (крыса, лягушка) мелко нарезают ножницами (желательно на холоду). Кашицу готовят непосредственно перед употреблением.
25. **Мышечный экстракт, свежий.** Мышцы свежееубитого животного (кролика, крысы, мыши, лягушки — *Rana temporaria*) замораживают до -1° или -2° и растирают в ступке на льду при температуре не выше 0° с охлажденным физиологическим раствором в отношении: 1 часть мышц к 4 частям физио-

логического раствора. Экстрагируют при помешивании 30 минут. Экстракт отделяют от нерастворившейся части мышц центрифугированием (около 20 минут) и сохраняют при температуре — 2° или — 3°. В таких условиях экстракт может сохраняться несколько часов. Готовить экстракт необходимо в день занятия.

26. α -Н а ф т о л, 0,2% р а с т в о р. 0,5 г α -нафтола растворяют в 50 мл этилового спирта. Перед употреблением 5 мл указанного основного раствора разводят в 5 раз водой.
27. Н и т р и т н о-м о л и б д а т н ы й р е а к т и в. Растворяют 5 г азотистокислого натрия и 5 г молибденовокислого натрия в 50 мл дистиллированной воды.
28. О к и с ь а л ю м и н и я, п р о к а л е н н а я. Окись алюминия прокалывают в фарфоровой чашке в течение 1½ — 2 часов.
29. О р ц и н о в ы й р е а к т и в. 1 г орцина растворяют в 500 мл 30% соляной кислоты (удельного веса 1,15) и добавляют 4 — 5 мл 10% раствора хлорного железа. Реактив хранят плотно закупоренным в темной склянке.
30. П е п с и н, 0,1% р а с т в о р в 0,2% с о л я н о й к и с л о т е. Слизистую оболочку желудка промывают физиологическим раствором (37°), измельчают в мясорубке и добавляют равный объем 0,4% соляной кислоты. Через сутки жидкость фильтруют через складчатый бумажный фильтр. Можно использовать также продажный препарат пепсина, который растворяют в количестве 1 г в 1 л 0,2% соляной кислоты и через несколько часов фильтруют.
31. П е п с и н, р а с т в о р д л я с в е р т ы в а н и я м о л о к а. К 100 мл 0,1% водного раствора сухого препарата пепсина добавляют 20 — 30 капель 2% соляной кислоты до pH=4,8 — 5,0. Раствору дают постоять 3 — 4 часа.

В качестве контрольного раствора 100 мл дистиллированной воды подкисляют таким же количеством 2% соляной кислоты, какое было добавлено к раствору пепсина.

32. П и р о в и н о г р а д н а я к и с л о т а. Кислый сернокислый калий нагревают около 30 минут при 220—250°. Расплавленной массе дают остыть в эксикаторе. 100 г полученного свежесплавленного препарата растирают в ступке с 50 г виннокаменной кислоты и 35 г

речного песка (промытого 5% соляной кислотой, водой и прокаленного). Полученную смесь помещают в реторту на 0,5 — 1 л и нагревают под тягой на масляной бане до 220°. При 220° собирают желто-красный дестиллят, отгоняют его при 12 мм остаточного давления и собирают отгон, кипящий при 50—70°. Вторично перегоняют под уменьшенным давлением и собирают дестиллят, кипящий при 62° и давлении 12 мм. Полученная пириновинная кислота (около 5 г) нестойка и при хранении постепенно разлагается. Поэтому лучше сохранять ее в 5 — 10% водном растворе, на холоду.

83. **Препарат поджелудочной железы.** Поджелудочную железу свиньи (или другого животного) освобождают от жира, измельчают, добавляют тройной объем ацетона и настаивают в течение 10 — 12 часов для обезжиривания. Ацетон сливают и обезжиривание ацетоном повторяют еще 1 — 2 раза. Отфильтровывают ацетон, осадок промывают спиртом, затем эфиром и просушивают на воздухе между листами фильтровальной бумаги. Полученную массу измельчают в ступке.

34. **Пробирки-эталон, содержащие стандартные растворы для определения витамина А по количеству «синих единиц».** Готовят стандартный раствор, содержащий 15 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,7 г $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ в 100 мл водного раствора. Из этого основного раствора готовят эталоны путем разведения водой, согласно нижеприведенной таблице:

№ раствора эталона	Основной раствор в мл	Вода в мл	Число «синих единиц»
	Основной раствор	—	9,2
1	20	0,4	9,0
2	20	1,6	8,5
3	20	3,0	8,0
4	20	4,5	7,5
5	20	6,3	7,0
6	20	8,7	6,5
7	20	11,6	6,0
8	10	7,3	5,5
9	10	9,5	5,0

Продолжение

№ раствора эталона	Основной рас- твор в мл	Вода в мл	Число «синих единиц»
10	10	12,2	4,5
11	10	15,8	4,0
12	10	20,6	3,5
13	10	27,7	3,0
14	10	37,1	2,5
15	10	52,0	2,0

В качестве пробирок-эталонов удобнее всего пользоваться пробирками высотой в 6 см и диаметром в 1 см, наливая в них по 4 мл соответствующего стандартного раствора. По заполнении пробирок их закрывают пробками, заливают менделеевской замазкой, вставляют по порядку в отверстия штатива и помечают соответственно количеству «синих единиц».

35. Раствор белка. 1 — 2 белка куриных яиц отделяют от желтков, взбалтывают с 1 л воды.
36. Раствор белка для реакций осаждения (не высаливанием). Белки куриных яиц отделяют от желтков, смешивают с 19 — 20-кратным объемом воды и фильтруют через несколько слоев марли.
37. Раствор белка, содержащий хлористый натрий, для высаливания и диализа. Белки трех куриных яиц отделяют от желтков, смешивают с 700 мл дистиллированной воды и с 300 мл насыщенного раствора хлористого натрия и фильтруют через несколько слоев марли.
38. Раствор галогеновых солей в уксусной кислоте. В 100 мл ледяной уксусной кислоты растворяют по 0,1 г KCl, KBr и KI. Навески солей следует предварительно растереть в ступке. Если соли растворились не полностью, раствор сливают с осадка.
39. Раствор иода в иодистом калии. В 100 мл воды растворяют 20 г иодистого калия и 10 г иода. Для реакции с крахмалом полученный раствор разводят в 5 раз водой.
40. Раствор иодной ртути в иодистом калии. В 50 мл дистиллированной воды растворяют

- 5 г иодистого калия. Насыщают раствор 12 г иодной ртути и доводят объем водой до 100 мл.
41. Раствор парадиметиламинобензальдегида. Продажный парадиметиламинобензальдегид перекристаллизовывают из горячей воды (1 — 2 г на 100 мл воды) и сушат в эксикаторе над хлористым кальцием.
- 2 г перекристаллизованного препарата растирают в ступке с небольшим количеством концентрированной соляной кислоты, переводят в маленький мерный цилиндр, доливают концентрированной соляной кислоты до 7,5 мл и водой до 15 мл.
42. Раствор сахаразы. 100 г высушенных дрожжей растирают в порошок, приливают 400 — 500 мл воды, взбалтывают в течение 1 — 2 часов и фильтруют. Фильтрация происходит медленно, поэтому можно оставить фильтровать на ночь. Полученный фильтрат используют для работы.
43. Раствор тирозина. 0,1 г тирозина растворяют в 200 мл 0,1% раствора Na_2CO_3 . Для ускорения растворения жидкость можно слегка нагреть на водяной бане.
44. Раствор хлористого цинка в спирте. 1 г хлористого цинка растворяют в 100 мл этилового спирта и подщелачивают раствором аммиака.
45. Растворы аминокислот для хроматографии. Аминокислоты растворяют в концентрации около 1/25 м.

В 10 мл растворяют:

Глутаминовой кислоты	60 мг
Аланина	40 »
Лейцина	50 »

Можно также пользоваться следующими комбинациями аминокислот (на 10 мл воды):

1. Глутаминовой кислоты 60 мг
Гликокола (глицина) 40 »
Аланина 40 »
2. Глутаминовой кислоты 60 »
Лейцина 50 »
3. Аспарагиновой кислоты 60 »
Серина 40 »
Лейцина 60 »
4. Аспарагиновой кислоты 60 »
Гликокола (глицина) 40 »
Лейцина 60 »

Для ускорения можно растворять аминокислоты при нагревании.

46. Р е а к т и в М и л л о н а. В 57 мл концентрированной азотной кислоты растворяют 40 г ртути, сначала на холоду, а затем слабо нагревая на водяной бане. Полученный раствор разбавляют 2 объемами воды, дают отстояться и сливают с осадка.
47. Р е а к т и в «Н а д и». За 1 — 2 часа до занятия готовят 1% водный раствор диметилпарафенилендиамина и смешивают его с равными объемами 1% раствора α -нафтола в спирте и 1,5% раствора углекислой соды. Реактив «Нади» окрашен в темнокоричневый цвет, но не должен иметь розового оттенка.
48. Р е а к т и в Н е с с л е р а. 15 г двуиодистой ртути и 10 г иодистого калия растворяют в 30 — 40 мл дистиллированной воды и сливают в мерную колбу на 500 мл. Отдельно растворяют 40 г едкого кали в 200 мл дистиллированной воды, вливают в мерную колбу и доводят общий объем до метки. Перемешав содержимое колбы, оставляют ее на 2 — 3 дня в темном месте.
Реактив отфильтровывают через стеклянную вату от избытка солей ртути и хранят в склянке из темного стекла.
49. Р е а к т и в Н и л а н д е р а. 2 г основного азотно-кислого висмута и 4 г сегнетовой соли растворяют (нагревая на кипящей водяной бане) в 100 мл 10% раствора едкого натра, охлаждают и отфильтровывают от выпавшего осадка.
50. Р е а к т и в С е л и в а н о в а. 0,05 г резорцина растворяют в 100 мл 20% соляной кислоты.
51. Р е а к т и в С т о к с а. Одну часть сернокислого железа и 2 части виннокаменной кислоты растворяют в 15 частях дистиллированной воды. Перед употреблением добавляют аммиак до слабо щелочной реакции. Раствор должен быть прозрачным и окрашенным в зеленый цвет.
52. Р о д а н и с т ы й а м м о н и й, 0,01 н. и 0,171 н. р а с т в о р ы. Отвешивают 0,8 г роданистого аммония, помещают навеску в мерную литровую колбу и доливают дистиллированной водой до метки. Титр раствора устанавливают по 0,01 н. раствору азотнокислого серебра (индикатором служат железоаммиачные квасцы). Для приготовления 0,171 н. раствора отвешивают соот-

- ветственно 14 г роданистого аммония и титр устанавливают по титрованному раствору азотнокислого серебра.
53. Ртуть азотнокислая окисная, 0,1 н. раствор. К 7 мл концентрированной азотной кислоты мелкими порциями при осторожном помешивании добавляют 11 г желтой окиси ртути. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 1 л и устанавливают титр по 0,1 н. раствору соляной кислоты.

Для установки титра к 10 мл титрованного раствора соляной кислоты добавляют 8 — 10 капель концентрированной азотной кислоты, 3 — 4 капли 30% раствора нитропруssiда натрия и оттитровывают раствором азотнокислой ртути до появления мути, не исчезающей в течение минуты.

54. Серная кислота удельного веса 1,82. К одному объему воды прибавляют 10 объемов концентрированной серной кислоты удельного веса 1,84.
55. Сернокислый аммоний, стандартный раствор, содержащий 0,05 мг азота в 1 мл. Отвешивают 235,7 мг химически чистого и высушенного до постоянного веса сернокислого аммония, переводят его с помощью дистиллированной воды в мерную колбу на 1 л и доводят дистиллированной водой до метки.
56. Треххлористая сурьма, насыщенный раствор в хлороформе. Треххлористую сурьму промывают небольшим количеством очищенного хлороформа до тех пор, пока не будет стекать бесцветный раствор, и высушивают в эксикаторе над серной кислотой. Из очищенного хлороформа и промытой треххлористой сурьмы готовят насыщенный раствор (при температуре около 20°).
57. Тройной хлор-цинк-иодистый раствор. 50 г сернокислого цинка и 250 г хлористого натрия помещают в колбу на 1 л, растворяют, доводят дистиллированной водой до метки и отфильтровывают. Перед употреблением в этом растворе растворяют 2,5% иодистого калия.
58. Трубки Метта. Яичный белок процеживают через полотно и помещают в вакуум-эксикатор на сутки для удаления растворенного воздуха. Насасывают белок в чистые и сухие стеклянные трубки с внутренним диаметром 1 — 2 мм таким образом, чтобы белок запол-

нгл. герм.
трубки
Нагреватель
ками. Ко
леевской
резают н
59. Фелли
два раст
натра ра
водой до
в мерной
Перед ун
творов «а
60. Фенол
матог
фенсла п
взбалтыва
воронке д
слой фено
тографии.
61. Флоро
Растворя
абсолютно
готовлении
62. Формо
лением.
водно-сп
тем 0,2
63. Фосфо
ный
Фосфо
в дистил
в мерной
64. Фосфо
щепиль
(Na_2HPO_4)
кулами
на стекл
защитен
воды, не
кислый
закончен
23 Практикум по

нил всю трубку без пузырьков воздуха. Наполненные трубки помещают в водяную баню при 60 — 70°. Нагревают баню до 90° и дают ей остыть вместе с трубками. Концы трубок запаивают парафином или менделеевской замазкой. Перед употреблением трубки разрезают на куски длиной около 2 см.

59. **Фелингова жидкость.** Готовят отдельно два раствора: а) 200 г сегнетовой соли и 150 г едкого натра растворяют в мерной литровой колбе и доводят водой до метки; б) 40 г медного купороса растворяют в мерной литровой колбе и доливают водой до метки. Перед употреблением смешивают равные объемы растворов «а» и «б».
60. **Фенол насыщенный водой, для хроматографии аминокислот.** 50 — 100 г фенола помещают в делительную воронку, энергично взбалтывают с 25 — 50 мл воды и оставляют стоять в воронке до разделения слоев (7 — 10 часов). Нижний слой фенола сливают в банку и используют для хроматографии.
61. **Флороглюцин-ванилиновый реактив.** Растворяют 2 г флороглюцина и 1 г ванилина в 50 мл абсолютного спирта. Реактив должен быть свежеприготовленным.
62. **Формольная смесь.** Готовится перед употреблением. К 50 мл формалина прибавляют 1 мл 0,05% водно-спиртового (1 : 1) раствора фенолфталена и затем 0,2 н. щелочи до слабо розового окрашивания.
63. **Фосфорнокислый калий, стандартный раствор,** содержащий 0,04 мг фосфора в 1 мл. 0,1757 г KH_2PO_4 растворяют в дистиллированной воде и доводят общий объем в мерной колбе до 1 л.
64. **Фосфорнокислый натрий двузамещенный с двумя частицами воды** ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Фосфорнокислый натрий с 12 молекулами воды ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) насыпают тонким слоем на стекло и оставляют на 12 — 14 дней в сухом месте, защищенном от пыли. Соль выветривается и, теряя часть воды, переходит в $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Когда фосфорнокислый натрий перестает терять вес, процесс считают законченным.

65. Фосфатный буфер, $pH = 8,0$. Отдельно растворяют 9,078 г первичного фосфата калия (KH_2PO_4) и 11,876 г вторичного фосфата натрия ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) в прокипяченной дистиллированной воде и доводят объем каждого раствора до 1 л.

Для получения фосфатного буфера $pH = 8,0$ смешивают один объем первого раствора с 19 объемами второго.

66. Хлороформ очищенный. Продажный химически чистый хлороформ промывают 2 — 3 раза дистиллированной водой и высушивают прокаленным поташем или безводным сернокислым натрием. Перегоняют в склянку из темного стекла.

67. Щелочной раствор. Готовят отдельно 5,76% раствор двууглекислого натрия и 4% раствор едкого натра. Перед употреблением смешивают равные объемы обоих растворов.

68. Щелочной раствор перманганата. 50 г марганцовокислого калия растворяют в 700—800 мл горячей (70 — 80°) воды, беря мелкие порции перманганата и воды и сливая их в отдельный сосуд. Отдельно растворяют 25 г едкого натра, смешивают оба раствора и доводят общий объем до 1 л.

69. Эйконоген (1, 2, 4-аминонафтолсульфоновокислый натрий), 0,25% раствор, содержащий сульфит и бисульфит. В 100 мл воды растворяют 15 г $NaHSO_3$, 0,5 г Na_2SO_3 и 0,25 г эйконогена. Раствор отфильтровывают от нерастворившегося осадка.

Азот
Алюминий
Барий
Бром
Водород
Железо
Иод
Калий
Кальций
Кислород
Литий
Магний
Марганец
Медь
Мышьяк
Натрий

II.

На

Соля
Азот
Серн
Хлор
Фосф
Укс

Раст

ТАБЛИЦЫ

I. Практические атомные веса некоторых элементов

Элемент	Атомный вес	Элемент	Атомный вес
Азот	14,01	Никель	58,69
Алюминий	26,97	Олово	118,70
Барий	137,36	Палладий	106,7
Бром	79,92	Платина	195,23
Водород	1,01	Ртуть	200,61
Железо	55,84	Свинец	207,21
Иод	126,92	Сера	32,06
Калий	39,10	Серебро	107,88
Кальций	40,08	Сурьма	121,76
Кислород	16,00	Углерод	12,01
Литий	6,94	Фосфор	30,98
Магний	24,32	Фтор	19,00
Марганец	54,93	Хлор	35,46
Медь	63,57	Хром	52,01
Мышьяк	74,91	Цинк	65,38
Натрий	23,00		

II. Удельные веса и молярные концентрации продажных растворов концентрированных кислот и аммиака

Наименование реактива	Удельный вес	Весовой процент	Молярная концентрация
Соляная кислота	1,19	37,2	12,0
»	1,18	35,4	11,3
Азотная	1,425	71,0	16,0
»	1,4	65,6	14,5
Серная	1,84	95,3	18,0
Хлорная	1,15	70	11,6
Фосфорная	1,69	85	14,7
Уксусная	1,05	99,5	17,4
»	1,075	80	14,3
Раствор аммиака	0,904	27	14,3
»	0,91	25	13,4
»	0,957	10	5,4

III. Удельные веса водных растворов едкого натра

Удельный вес d_{4}^{15}	% едкого натра ¹	1 л содержит едкого натра в г	Удельный вес d_{4}^{15}	% едкого натра	1 л содержит едкого натра в г
1,007	0,61	6,143	1,220	19,58	238,88
1,014	1,20	12,168	1,231	20,59	253,46
1,022	2,00	20,440	1,241	21,42	265,82
1,029	2,71	27,886	1,252	22,64	283,45
1,037	3,35	35,860	1,263	23,67	298,95
1,045	4,00	41,800	1,274	24,81	316,08
1,052	4,64	48,813	1,285	25,80	331,53
1,060	5,29	56,074	1,297	26,83	347,99
1,067	5,87	62,632	1,308	27,80	363,63
1,075	6,55	70,412	1,320	28,83	378,56
1,083	7,31	79,167	1,332	29,93	398,67
1,091	8,00	87,280	1,345	31,22	429,91
1,100	8,68	95,480	1,357	32,47	440,62
1,108	9,42	104,374	1,370	33,69	461,55
1,116	10,06	112,270	1,383	34,96	483,50
1,125	10,97	123,413	1,397	36,25	508,41
1,134	11,84	134,263	1,410	37,47	528,33
1,142	12,64	144,349	1,424	38,80	552,51
1,152	13,55	156,096	1,438	39,99	575,06
1,162	14,37	166,980	1,453	41,41	601,69
1,171	15,13	177,172	1,468	42,83	628,75
1,180	15,91	187,74	1,483	44,38	658,16
1,190	16,77	199,56	1,498	46,15	678,33
1,200	17,67	212,04	1,514	47,60	720,66
1,210	18,58	224,82	1,530	49,02	750,00

IV. Удельные веса водных растворов едкого кали

Удельный вес d_{4}^{15}	% едкого кали	1 л раствора содержит едкого кали в г
1,007	0,9	9
1,014	1,7	17
1,022	2,6	26
1,029	3,5	36
1,037	4,5	46

¹ В настоящей таблице, а также в последующих даны весовые проценты содержания растворенного вещества.

Продолжение

Удельный вес d_{4}^{15}	% едкого кали	1 л раствора содержит едкого кали в г
1,045	5,6	58
1,052	6,4	67
1,060	7,4	78
1,067	8,2	88
1,075	9,2	99
1,083	10,1	109
1,091	10,9	119
1,100	12,0	132
1,108	12,9	143
1,116	13,8	153
1,125	14,8	167
1,134	15,7	178
1,142	16,5	188
1,152	17,6	203
1,162	18,6	216
1,171	19,5	228
1,180	20,5	242
1,190	21,4	255
1,200	22,4	269
1,210	23,3	282
1,220	24,2	295
1,231	25,1	309
1,241	26,1	324
1,252	27,0	338
1,263	28,0	353
1,274	28,9	368
1,285	29,8	385
1,297	30,7	398
1,308	31,8	416
1,320	32,7	432
1,332	33,7	449
1,345	34,9	469
1,357	35,9	487
1,370	36,9	506
1,383	37,8	522
1,397	38,9	543
1,410	39,9	563
1,424	40,9	582
1,438	42,1	605
1,453	43,4	631
1,468	44,6	655
1,483	45,8	679
1,498	47,1	706
1,514	48,3	731

V. Удельные веса водных растворов аммиака

Удельный вес d_{15}^{15}	% аммиака	1 л содержит аммиака в г	Удельный вес d_{15}^{15}	% аммиака	1 л содержит аммиака в г
1,000	0,00	0,0	0,940	15,63	146,9
0,998	0,45	4,5	0,938	16,22	152,1
0,996	0,91	9,1	0,936	16,82	157,4
0,994	1,37	13,6	0,934	17,42	162,7
0,992	1,84	18,2	0,932	18,03	168,1
0,990	2,31	22,9	0,930	18,64	173,4
0,988	2,80	27,7	0,928	19,25	178,6
0,986	3,30	32,5	0,926	19,87	184,2
0,984	3,80	37,4	0,924	20,49	189,3
0,982	4,30	42,2	0,922	21,12	194,7
0,980	4,80	47,0	0,920	21,75	200,1
0,978	5,30	51,8	0,918	22,39	205,6
0,976	5,80	56,6	0,916	23,03	210,9
0,974	6,30	61,4	0,914	23,68	216,3
0,972	6,80	66,1	0,912	24,33	221,9
0,970	7,31	70,9	0,910	24,99	227,4
0,968	7,82	75,7	0,908	25,65	232,9
0,966	8,33	80,5	0,906	26,31	238,3
0,964	8,84	85,2	0,904	26,98	243,9
0,962	9,35	89,9	0,902	27,65	249,4
0,960	9,91	95,1	0,900	28,33	255,0
0,958	10,47	100,3	0,898	29,01	260,5
0,956	11,03	105,4	0,896	29,69	266,0
0,954	11,60	110,7	0,894	30,37	271,5
0,952	12,17	115,9	0,892	31,05	277,0
0,950	12,74	121,0	0,890	31,75	282,6
0,948	13,31	126,2	0,888	32,50	288,6
0,946	13,88	131,3	0,886	33,25	294,6
0,944	14,46	136,5	0,884	34,10	301,4
0,942	15,04	141,7	0,882	34,95	308,3

VI. Удельные веса растворов серной кислоты

Удельный вес d_4^{15}	% H_2SO_4	1 л содержит H_2SO_4 в г	Удельный вес d_4^{15}	% H_2SO_4	1 л содержит H_2SO_4 в г
1,000	0,09	1	1,440	54,07	779
1,020	3,03	31	1,460	55,97	817
1,040	5,96	62	1,480	57,83	856
1,060	8,77	93	1,500	59,70	896
1,080	11,60	125	1,520	61,59	936
1,100	14,35	158	1,540	63,43	977
1,120	17,01	191	1,560	65,20	1 017
1,140	19,61	223	1,580	66,95	1 058
1,160	22,19	266	1,600	68,70	1 099
1,180	24,76	292	1,620	70,42	1 141
1,200	27,32	328	1,640	72,12	1 182
1,220	29,84	363	1,660	73,81	1 225
1,240	32,28	400	1,680	75,50	1 262
1,260	34,57	435	1,700	77,17	1 318
1,280	36,87	472	1,720	78,92	1 357
1,300	39,19	510	1,740	80,68	1 404
1,320	41,50	548	1,760	82,44	1 451
1,340	43,74	586	1,780	84,50	1 504
1,360	45,88	624	1,800	86,92	1 564
1,380	48,00	662	1,820	90,05	1 639
1,400	50,11	702	1,840	95,60	1 759
1,420	52,15	740	1,841	98,20	1 808
			1,839	99,12	1 823

VII. Удельные веса растворов соляной кислоты

Удельный вес d_4^{15}	% HCl	1 л содержит HCl в г	Удельный вес d_4^{15}	% HCl	1 л содержит HCl в г
1,000	0,16	1,6	1,105	20,97	232
1,005	1,15	11,6	1,110	21,92	243
1,010	2,14	21,6	1,115	22,86	255
1,015	3,12	31,7	1,120	23,82	267
1,020	4,13	42,1	1,125	24,78	278
1,025	5,15	52,8	1,130	25,75	291
1,030	6,15	63,3	1,135	26,70	303
1,035	7,15	74	1,140	27,66	315
1,040	8,16	85	1,145	28,61	328
1,045	9,16	96	1,150	29,57	340
1,050	10,17	107	1,155	30,55	353
1,055	11,18	118	1,160	31,52	366
1,060	12,19	129	1,165	32,49	379
1,065	13,19	141	1,170	33,46	392
1,070	14,17	152	1,175	34,42	404
1,075	15,13	163	1,180	35,39	418
1,080	16,15	174	1,185	36,31	430
1,085	17,13	186	1,190	37,23	443
1,090	18,11	197	1,195	38,16	456
1,095	19,06	209	1,200	39,11	469
1,100	20,01	220			

VIII. Удельные веса растворов азотной кислоты

Удельный вес d_4^{15}	% HNO_3	1 л содержит HNO_3 в г	Удельный вес d_4^{15}	% HNO_3	1 л содержит HNO_3 в г
1,000	1,10	1	1,260	41,34	521
1,010	1,90	19	1,270	42,87	544
1,020	3,70	38	1,280	44,41	568
1,030	5,50	57	1,290	45,95	593
1,040	7,26	75	1,300	47,49	617
1,050	8,99	94	1,310	49,07	643
1,060	10,68	113	1,320	50,71	669
1,070	12,33	132	1,330	52,37	697
1,080	13,95	151	1,340	54,07	725
1,090	15,53	169	1,350	55,79	753
1,100	17,11	188	1,360	57,57	783
1,110	18,67	207	1,370	59,39	814
1,120	20,23	227	1,380	61,27	846
1,130	21,77	246	1,390	63,23	897
1,140	23,31	266	1,400	65,30	914
1,150	24,84	286	1,410	67,50	952
1,160	26,36	306	1,420	69,80	991
1,170	27,88	326	1,430	72,17	1 032
1,180	29,38	347	1,440	74,08	1 075
1,190	30,88	367	1,450	77,28	1 121
1,200	32,36	388	1,460	79,98	1 168
1,210	33,82	409	1,470	82,90	1 219
1,220	35,28	430	1,480	86,05	1 274
1,230	36,78	452	1,490	89,50	1 335
1,240	38,29	475	1,500	94,90	1 411
1,250	39,82	498			

**IX. Индикаторы для ацидиметрического титрования
и колориметрического определения pH**

Наименование индикатора	Окраска		Интервал перехода ок- раски (pH)	Точка пе- рехода (по- ловинный показа- тель—pH)
	в кислой среде	в щелочной среде		
Кристалловый фиолетовый	Зеленая	Фиолетовая	0,0—2,0	1,0
Тропеолин 00	Розовая	Желтая . . .	1,4—2,6	2,0
Парадиметилами- ноазобензол (диметиловый желтый)	Красная	» . . .	2,9—4,0	3,2
Конго красный	Темносиняя	Красная . .	3,0—5,2	4,1
Метиловый оран- жевый	Красная	Желтая . .	3,1—4,4	3,5
Бромкрезоловый зеленый	Желтая	Синяя . . .	4,0—5,6	
Метиловый крас- ный	Красная	Желтая . .	4,2—6,3	5,3
Ализарин красный (ализаринсуль- фоновокислый натрий)	Желтая	Пурпурно- красная	5,0—6,8	6,2
Азолитмин (со- ставная часть лакмуса)	Красная	Синяя . . .	5,0—8,0	6,5
Бромтимоловый синий	Желтая	» . . .	6,0—7,6	7,3
Нейтральный красный	Красная	Оранжевая	6,8—8,0	6,9
Феноловый крас- ный	Желтая	Красная	6,8—8,4	8,0
Крезоловый крас- ный	»	»	7,2—8,8	8,4
Фенолфталеин	Бесцветная	»	8,2—10,0	9,1
Тимолфталеин	»	Синяя . . .	9,3—10,5	10,0
Ализарин желтый	Желтая	Лиловая	10,1—12,0	11,1

X. Давление насыщенного водяного пара

Темпера- тура	Давление в миллиметрах ртутного столба	Темпера- тура	Давление в миллиметрах ртутного столба	Темпера- тура	Давление в миллиметрах ртутного столба
10°	9,209	15°	12,79	20°	17,54
11°	9,84	16°	13,63	21°	18,65
12°	10,52	17°	14,53	22°	19,83
13°	11,23	18°	15,48	23°	21,07
14°	11,99	19°	16,48	24°	22,38

Темпера- тура	Давление в миллиметрах ртутного столба	Темпера- тура	Давление в миллиметрах ртутного столба	Темпера- тура	Давление в миллиметрах ртутного столба
25°	23,76	30°	31,82	35°	42,18
26°	25,21	31°	33,70	36°	44,65
27°	26,74	32°	35,66	37°	47,07
28°	28,35	33°	37,73	38°	49,69
29°	30,04	34°	39,90	39°	52,44
				40°	55,32

XI. Состав крови человека

Составные части	Цельная кровь	Плазма и сыворотка
Активная реакция (pH)	7,4	7,4
Удельный вес	1,050—1,060	1,029—1,034
Вода (в %)	75—85	90—91
Сухой остаток (в %)	15—25	9—10
Щелочной резерв (в об.% CO ₂)		50—70
Натрий (в мг%)	180—220	300—340
Калий (в мг%)	150—220	15—20
Кальций общий (в мг%)	4,2—8,6	9—11
Магний (в мг%)	2,3—4,0	1,7—2,0
Железо (в мг%)	50—60	Следы
Медь (в мг%)	0,6—1,2	»
Сера общая (в мг%)	155—231	114
» сульфатов (в мг%)	2,2	2,8
Хлор (в мг %)	290—320	360—380
Хлористый натрий (в мг%)	470—530	570—630
Фосфор общий (в мг%)	30—50	10—15
» неорганический (в мг%)	1,5—3	2,5—5
Сахар (глюкоза) (в мг%)	80—120	80—120
Белки (в %)	16—21	6,5—8,5
Гемоглобин (в %)	14—16	—
Фибриноген (в %)		0,2—0,4
Сывороточный альбумин (в %)		4,0—4,5
» глобулин (в %)		2,0—3,0
Азот общий (в %)	2,6—3,5	1,2
» остаточный (в мг%)	25—35	20—30
» аминокислот (в мг%)	6—8	5—6
» полипептидов (в мг%)	4—10	2—6
Мочевина в (мг%)	20—30	20—30
Креатин (в мг%)	3—5	1—1,5
Креатинин (в мг%)	1—2	1—2
Жир общий (в мг%)	200—400	200—400
Холестерин общий (в мг%)	150—200	150—250
Лецитины (фосфатиды) (в мг%)	150—250	100—200
Билирубин (в мг%)		0,2—0,8
Каротин (в мг%)		0,01—0,06
Амилаза (d $\frac{30}{38^\circ}$)		10—80

XII. Состав мочи человека
(выделяется за сутки в граммах)

Среднее количество	1 200—1 500 мл
Удельный вес	1,010—1,025
pH	5—7
Сухой остаток	47—65
Cl'	5—11
SO ₄ ''	1,8—3,6
PO ₄ '''	2—6,7
Na ⁺	3,0—5,2
K ⁺	2,0—3,3
Ca ⁺⁺	0,2—0,3
Mg ⁺⁺	0,06—0,2
NH ₄	0,6—1,3
Органические вещества	22—46
Мочевина	20—35
Мочевая кислота	0,3—1,2
Пуриновые основания	0,015—0,045
Креатинин	1,5—2,4
Гиппуровая кислота	0,1—2,0
Парные эфиросерные кислоты	0,07—0,85
Индикан	0,001—0,038
Уробилиноген	0,020—0,035
Урохром	0,2—0,9
Ацетон+ацетоуксусная кислота	0,009
Белок	0,003—0,009

Пре
Пре

Цвет
Реак
Диал
Опре
Кисл
Опре
ти

* Пол
* Реа
Полу
Гидр

Гидр
Терм
Спец
Влия
Качес
Качес
Качес
Качес
Качес
Коли
* Кол
Опре
* Кол
и
* Кол
* Фер

Качес
* Кол
* Кол

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие ко второму изданию	Стр. 3
Предисловие к первому изданию	4

Химия белков

Цветные реакции на белки	8
Реакции осаждения белков	19
Диализ белка	29
Определение изоэлектрической точки белка	30
Кислотный гидролиз белков	34
Определение азота аминных групп методом формольного титрования	37

Нуклеопротеиды

* Получение дезоксирибонуклеопротеида	44
* Реакция на дезоксирибонуклеиновую кислоту	45
Получение нуклеопротеида из дрожжей	46
Гидролиз нуклеопротеида	47

Ферменты

Гидролиз крахмала	50
Термолабильность ферментов	54
Специфичность ферментов	56
Влияние pH на действие ферментов	58
Качественная реакция на уреазу	61
Качественные реакции на оксидазы	62
Качественные реакции на пероксидазу	65
Качественная реакция на каталазу	67
Качественные реакции на дегидразы	68
Количественное определение дегидраз мышц	70
* Количественное определение протеиназ по способу Метта	72
Определение амилазной активности слюны и мочи	73
* Количественное определение каталазы крови по Баху	76
и Зубковой	79
* Количественное определение липазы	81
* Ферментативный синтез изоамиломасляного эфира	81

Витамины и гормоны

Качественная реакция на витамин А	84
* Количественное определение витамина А	86
* Количественное определение каротина по Рачевскому	90
	345

	Стр.
Разделение каротиноидов методом хроматографической адсорбции по Цвету	93
Реакция на витамин В ₁ (тиамин)	95
Реакция на никотиновую кислоту и ее амид	96
Определение витамина С	98
Реакция на адреналин	103

Липиды и их обмен

Обнаружение жиров	105
Растворение и эмульгирование жиров	107
Переваривание жиров	108
Реакции на ацетоновые тела	111
Реакции на холестерин	114
Обнаружение холестерина в мозгу	117
* Количественное определение холестерина в крови по Энгельгардту и Смирновой	118
Обнаружение лецитина в желтке куриного яйца	123

Углеводы и их обмен

Качественные реакции на углеводы	127
Переваривание крахмала амилазой поджелудочного сока	137
Количественное определение сахара в крови	138
* Количественное определение сахара в крови при сахарной нагрузке	142
Влияние инсулина на количество сахара в крови	144
Влияние адреналина на количество сахара в крови	147
Проба на брожение	148
Использование неорганического фосфата в процессе брожения	151
Гликолиз	153

Обмен белков

Переваривание белка пепсином	159
Переваривание белка трипсином	160
* Действие эрепсина на пептон	163
Освобождение биологических жидкостей от белков	164
Определение общего и остаточного азота в сыворотке крови	165
Определение свободных аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге	177
* Переаминирование аминокислот	181
* Определение аминокислот газометрическим методом по Цуверкалову	184
Качественные реакции на мочевины	191
Количественное определение мочевины в моче по Лордину	195
Количественное определение аммиака в моче	204
Реакции на креатинин	206
Обнаружение креатина в мышечной ткани	208
Обнаружение карнозина в мышечной ткани	209
Количественное определение креатинина и креатина в моче	210
Мочевая кислота	213

Кровь

	Стр.
* Свертывание крови	217
* Определение скорости свертывания крови	220
* Определение протромбина по Боровской и Ровинской	221
* Определение щелочного резерва кровяной плазмы	224
Получение кристаллов гемина	233
Гваяковая проба на кровь	235
Бензидиновая проба на кровь	236
Спектральный анализ пигментов крови	236
Проба на карбоксигемоглобин	239
Исследование кровяных пятен	240
* Определение количества гемоглобина	241
Определение кальция в сыворотке крови	243
Определение хлора в крови	246
* Определение неорганических фосфатов в сыворотке крови	249

Желчь

Реакции на желчные пигменты	251
Реакции на желчные кислоты	254
Обнаружение холестерина в желчных камнях	256

Желудочный сок

Реакции на свободную соляную кислоту	259
Реакция на молочную кислоту	261
Титрование кислот желудочного содержимого	262
Реакция на кровь в желудочном соке	267
Открытие желчи в желудочном соке	268

Моча

Определение удельного веса мочи	270
Исследование цвета мочи	271
Исследование прозрачности мочи	271
Исследование запаха мочи	272
Определение реакции мочи	272
Колориметрическое определение рН мочи	273
Реакция на хлориды	274
Количественное определение хлоридов в моче	274
Реакция на сульфаты	278
Реакция на фосфаты	279
Качественные реакции на белок в моче	280
Количественное определение белка	282
Качественные реакции на сахар в моче	283
Количественное определение сахара в моче	286
Реакции на ацетоновые тела в моче	291
Качественные реакции на кровяные пигменты в моче	293
Реакции на желчные пигменты в моче	295
Реакция на желчные кислоты в моче	296
Реакции на уробилин и уробилиноген	296

Реакции на индикан	Стр. 299
Микроскопическое исследование мочи	300
* Анализ мочевых осадков и сростков	302

Молоко

Исследование молока под микроскопом	308
Белки молока	309
Ферментативное свертывание казеиногена пепсином	310
Реакции на молочный сахар	311
Обнаружение молочной кислоты в кислом молоке	312
* Реакция Умикова на отличие женского молока от коровьего	313
Определение удельного веса молока	314
Определение кислотности молока	315
* Количественное определение жира в молоке	316
* Количественное определение белков в молоке	319
Приложение	321
Приготовление реактивов	321
Таблицы I — XII	335—344

*Збарский Борис Ильич
Збарский Илья Борисович
Солнцев Александр Иванович*

Практикум по биологической химии

* * *

*Редактор Б. Н. Степаненко
Техн. редактор К. К. Сенчило
Корректор О. В. Соколова
Переплет художника А. В. Петрова*

Сдано в набор 31/III 1954 г. Подписано к печати 3/VII 1954 г.
Формат 84×108^{1/32} 5,44 бум. л. 17,83 печ. л. + 0,20 печ. л.
(вкл.). 18,05 уч.-изд. л. Тираж 40000 экз. Т 04292. МУ-21.

Медгиз, Москва, Петровка, 12.

Заказ 316. 1-я типография Трансжелдориздата МПС
Москва, Б. Переяславская ул., д. 46
Цена 5 р. 50 к. Переплет 1 руб.

12/18/2000



6 р. 50 к.

ПРАКТИКА ИТО БОГОСЛОВІЯ ХРИСТИАН